



Scientific Medical Journal  
Established in October 2004

Заснований у жовтні 2004 р.  
Виходить один раз на 4 місяці

2015, №1 (33)  
(січень – квітень)

**Editorial Board**

Editor-in-Chief - V.A. Tumanskiy,  
Deputy Editor-in-Chief - A.V. Abramov,  
Executive secretary - S.I. Tertysnyi,  
O.Ye. Berezin (Zaporizhzhya, Ukraine),  
V.I. Cherniy (Donetsk, Ukraine),  
V.N. Elskiy (Donetsk, Ukraine),  
S.G. Gichka (Kiev, Ukraine),  
Yu.M. Kolesnik (Zaporizhzhya, Ukraine),  
V.D. Markovsky (Kharkiv, Ukraine),  
V.F. Mislitskiy (Chernivtsi, Ukraine),  
A.A. Moybenko (Kiev, Ukraine),  
A.G. Reznikov (Kiev, Ukraine),  
A.M. Romanenko (Kiev, Ukraine),  
V.A. Shavrin (Zaporizhzhya, Ukraine),  
G.A. Shifrin (Zaporizhzhya, Ukraine),  
V.G. Shlopov (Donetsk, Ukraine),  
G.G. Skibo (Kiev, Ukraine),  
I.S. Shpon'ka (Dnipropetrovsk, Ukraine),  
T.D. Zadorozhnaya (Kiev, Ukraine),  
D.D. Zerbino (Lviv, Ukraine)

**Scientific Editorial board**

Samir S. Amr (Dhahran, Saudi Arabia),  
N.M. Anichkov (St. Petersburg, Russia),  
Ya.Ya. Bodnar (Ternopil, Ukraine),  
Ch. Busch (Uppsala, Sweden),  
P. I. Cherviak (Kiev, Ukraine),  
I.S. Davidenko (Chernivtsi, Ukraine),  
V.I. Filimonov (Zaporizhzhya, Ukraine),  
Sh. Fukushima (Kanagawa, Japan),  
A.S. Gavrish (Kiev, Ukraine),  
A.I. Gozhenko (Odessa, Ukraine),  
M. Jelen (Wroclaw, Poland),  
F. Joubert (Paris, France),  
L.V. Kaktursky (Moscow, Russia),  
N.A. Klimenko (Kharkiv, Ukraine),  
G. Kontogeorgos (Athens, Greece),  
N.S. Mykhailovska (Zaporizhzhya, Ukraine),  
I.M. Michailiuk (Ivano-Frankivsk, Ukraine),  
B. Nathwani (Los Angeles, USA),  
M.K. Nedz'ved' (Minsk, Belarus),  
M.A. Paltsev (Moscow, Russia),  
Yu.A. Pospishil (Lviv, Ukraine),  
I.S. Reshetnikova (Lugansk, Ukraine),  
V.P. Silchenko (Kiev, Ukraine),  
I.V. Sorokina (Kharkiv, Ukraine),  
V.P. Tereschenko (Kiev, Ukraine),  
E.L. Tumanova (Moscow, Russia),  
I.V. Vasilenko (Donetsk, Ukraine),  
A.F. Yakovtsova (Kharkiv, Ukraine)

Journal of «ПАТОЛОГІЯ»  
<http://pat.zsmu.edu.ua>  
Mayakovsky Avenue, 26, Zaporizhzhya,  
69035, UKRAINE  
Tel./fax: +38 (061) 233-02-34  
[tumanskiy@zsmu.zp.ua](mailto:tumanskiy@zsmu.zp.ua);  
[med.jur@zsmu.zp.ua](mailto:med.jur@zsmu.zp.ua)

**РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ:**

ГОЛОВНИЙ РЕДАКТОР – ПРОФ. В.О. ТУМАНСЬКИЙ,  
ЗАСТ. ГОЛ. РЕДАКТОРА – ПРОФ. А.В. АБРАМОВ,  
ВІДПОВІДАЛЬНИЙ СЕКРЕТАР – ПРОФ. С.І. ТЕРТИШНИЙ,  
ПРОФ. О.С. БЕРЕЗІН (Запоріжжя),  
ЧЛ.-КОР. НАМН України, ПРОФ. В.М. ЄЛЬСЬКИЙ (Донецьк),  
ПРОФ. С.Г. ГИЧКА (Київ), ПРОФ. Т.Д. ЗАДОРОЖНА (Київ),  
АКАДЕМІК НАМН, ЧЛ.-КОР. НАН України, ПРОФ. Д.Д. ЗЕРБИНО (Львів),  
ПРОФ. Ю.М. КОЛЕСНИК (Запоріжжя), ПРОФ. В.Д. МАРКОВСЬКИЙ (Харків),  
ПРОФ. В.Ф. МИСЛИЦЬКИЙ (Чернівці),  
АКАДЕМІК НАН України, ПРОФ. О.О. МОЙБЕНКО (Київ),  
ЧЛ.-КОР. НАН ТА НАМН України, ПРОФ. О.Г. РЕЗНІКОВ (Київ),  
АКАДЕМІК НАМН, ЧЛ.-КОР. НАН України, ПРОФ. А.М. РОМАНЕНКО (Київ),  
ПРОФ. Г.Г. СКІБО (Київ),  
ЧЛ.-КОР. НАМН України, ПРОФ. В.І. ЧЕРНІЙ (Донецьк),  
ПРОФ. В.О. ШАВРІН (Запоріжжя), ПРОФ. Г.А. ШИФРІН (Запоріжжя),  
ПРОФ. В.Г. ШЛОПОВ (Донецьк), ПРОФ. І.С. ШПОНЬКА (Дніпропетровськ)

**РЕДАКЦІЙНА РАДА:**

ПРОФ. САМІР С. АМР (Дахран, Саудівська Аравія),  
ЧЛ.-КОР. РАМН, ПРОФ. Н.М. АНІЧКОВ (Санкт-Петербург),  
ПРОФ. Я.Я. БОДНАР (Тернопіль),  
ПРОФ. КРИСТЕР БУШ (Уппсала, Швеція), ПРОФ. І.В. ВАСИЛЕНКО (Донецьк),  
ПРОФ. О.С. ГАВРИШ (Київ), ПРОФ. А.І. ГОЖЕНКО (Одеса),  
ПРОФ. І.С. ДАВИДЕНКО (Чернівці), ПРОФ. ФРЕНСІС ЖУБЕР (Париж, Франція),  
ЧЛ.-КОР. РАМН, ПРОФ. Л.В. КАКТУРСЬКИЙ (Москва), ПРОФ. М.О. КЛИМЕНКО (Харків),  
ПРОФ. ДЖОРДЖ КОНТОГЕОРГОС (Афіни, Греція),  
ПРОФ. Н.С. МИХАЙЛОВСЬКА (Запоріжжя),  
ПРОФ. МІХАЛ ЄЛЕНЬ (Вроцлав, Польща), ПРОФ. І.М. МИХАЙЛОК (Івано-Франківськ),  
ПРОФ. БАРАТ НАТВАНІ (Лос Анжелес, США), ПРОФ. М.К. НЕДЗЬВЕДЬ (Мінськ),  
АКАДЕМІК РАМН, ПРОФ. М.А. ПАЛЬЦЕВ (Москва),  
ПРОФ. Ю.О. ПОСПИШІЛЬ (Львів), ПРОФ. О.С. РЕШЕТНИКОВА (Луганськ),  
ПРОФ. І.В. СОРОКІНА (Харків), ПРОФ. В.П. СІЛЬЧЕНКО (Київ),  
ПРОФ. В.П. ТЕРЕШЕНКО (Київ), ПРОФ. Є.Л. ТУМАНОВА (Москва),  
ПРОФ. В.І. ФІЛІМОНОВ (Запоріжжя), ПРОФ. П.І. ЧЕРВ'ЯК (Київ),  
ПРОФ. ШОДЖИ ФУКУШИМА (Канагава, Японія), ПРОФ. А.Ф. ЯКОВЦОВА (Харків)

Свідоцтво про реєстрацію КВ № 20604-10404 від 27.02.2014 р.  
АТЕСТОВАНИЙ як наукове фахове видання, в якому можуть публікуватися  
результати дисертаційних робіт в галузі медичних наук  
(Наказ Міністерства освіти і науки України № 1081 від 29.09.2014 р.)  
Адреса редакції і видавця: 69035, Україна, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26,  
ЗДМУ, редакційно-видавничий відділ, тел.: +38 (061) 233-02-34,  
E-mail: [tumanskiy@zsmu.zp.ua](mailto:tumanskiy@zsmu.zp.ua), [med.jur@zsmu.zp.ua](mailto:med.jur@zsmu.zp.ua)  
Веб-сайт журналу: <http://pat.zsmu.edu.ua>  
Начальник відділу – В.М. Миклашевський,  
літературний редактор – О.С. Савеленко, технічний редактор – О.І. Чумакова  
Статті, що надходять до журналу, рецензуються за процедурою Double-blind.  
Електронні копії опублікованих статей передаються до  
Національної бібліотеки ім. Вернадського для вільного доступу в режимі on-Line.  
Реферати статей публікуються в «Українському реферативному журналі»,  
серія «Медицина».

Передплатний індекс – 95911

Редакція може публікувати матеріали, не поділяючи думки авторів.  
Рекомендовано до друку Вченою радою ЗДМУ, протокол №9 від 21.04.2015 р.

Підписано до друку 24.04.2015 р. Віддруковано в друкарні ТОВ «Х-ПРЕСС»  
Формат 60x84/8. 69068, м. Запоріжжя, вул. Кругова, 165/18  
Папір крейдяний тел. (061) 220-42-29  
Умов. друк. арк. 6 Свідоцтво про державну реєстрацію  
Тираж 200 прим. Зам. № 4/15 АОО №198468 від 01.07.1999 р.  
© Запорізький державний медичний університет, 2014

## Огляди

**Каменщик А. В., Іванько О. Г., Федченко А. В.**  
Нуклеарний фактор активованих Т-клітин (NFATC)  
як можливий діагностичний і прогностичний маркер  
при клапанних вроджених вадах серця та гіпертрофії міокарда

## Оригінальні дослідження

**Родинський О. Г., Козлова Ю. В., Гузь Л. В.**  
Динаміка патологічних змін структури міокарда щурів  
за умов введення доxorубіцину

**Яковцова А. Ф., Марковський В. Д., Сорокіна І. В.,  
Борзенкова І. В., Плітень О. М., Мирошніченко М. С.,  
Калужина О. В.**

Морфофункціональні особливості серцево-судинної  
системи плодів і новонароджених від матерів  
з ускладненою вагітністю: основні здобутки харківської  
школи патологоанатомів

**Калужина О. В.**

Морфологічний стан аорти у плодів і новонароджених,  
які перенесли хронічну внутрішньоутробну гіпоксію  
(експериментальне дослідження)

**Туманський В. А., Зубко М. Д.**

Характеристика рівня експресії MMP-9 і TIMP-1  
в гепатоцелюлярном і холангіоцелюлярном раке печени

**Базалицька С. В., Романенко А. М.**

Гістопатологічні зміни та імуногістохімічна експресія  
протеїну ubiquitin у перитуморальній тканині  
при герміногенних пухлинах яєчка

**Тертишний С. І.,Voteva В. Е.**

Експресія Pan cytokeratin в менингиомах головного мозга

**Кузык Ю. І.**

Фібром'язова дисплазія внутрішніх сонних артерій

**Путілін Д. А., Камішний О. М.**

Розподіл FoxP3+ регуляторних Т-клітин у панкреатичних  
лімфатичних вузлах у щурів при стрептозотодин-  
індукованому діабеті та при корекції метформіном

**Грабовий О. М., Антонюк С. А., Сільченко В. П.,  
Воробей Є. А., Савчин Т. М.**

Питомий вміст ДНК у ядрах клітин і клітинна  
гетерогенність аденокарцином товстої кишки

**Задорожна Т. Д., Подольський В. В., Парницька О. І.,  
Єщенко О. І., Киликевич С. М., Арчакова Т. М.,  
Давидова Ю. В., Скрипченко Н. Я., Гребініченко Г. О.**

Морфологічні та імуногістохімічні особливості  
плацентарно-ендометріальних структур при доброякісних  
і злоякісних пухлинах у жінок

**Бакурова О. М., Бузіна Р. В., Кондратюк Р. Б.,  
Гульков Ю. К., Василенко І. В., Борзенко Б. Г.**

Тимідинфосфорилаза та можливий зв'язок із формуванням  
особливостей фенотипу раку легенів

**Григоровський В. В., Зима А. Н., Гук Ю. Н.,  
Магомедов С., Гайко О. Г., Кінчя-Полищук Т. А.**

Статистические характеристики и корреляции  
гистоморфометрических, клинических и биохимических  
показателей при системной терапии у больных  
несовершенным остеогенезом

**Шукин Д. В., Яковцова И. И., Лесовой В. Н., Данилюк С. В.,  
Бабич М. Н., Товажнянская В. Д., Демченко В. Н.**

Имуногистохимические характеристики почечно-  
клеточного рака с внутривенным распространением

## Reviews

4 **Kamenshchuk A. V., Ivanko O. G., Fedchenko A. V.**  
Nuclear factor of activated T-cells (NFATC) as a possible  
diagnostic and prognostic marker in congenital valvular  
diseases and myocardial hypertrophy

## Original researches

8 **Rodinskij A. G., Kozlova Ju. V., Guz' L. V.**  
Dynamics of pathological changes of myocardial structures  
of rats under administration of doxorubicin

12 **Yakovtsova A. F., Markovsky V. D., Sorokina I. V.,  
Borzenkova I. V., Pliten O. N., Myroshnychenko M. S.,  
Kaluzhina O. V.**

Morphological and functional characteristics of the  
cardiovascular system of fetuses and newborns from mothers  
with complicated pregnancy: the main achievements of the  
pathologists of Kharkiv school

17 **Kaluzhina O. V.**

Morphological state of aorta in the fetuses and newborns  
suffered from chronic intrauterine hypoxia  
(experimental research)

20 **Tumanskiy V. A., Zubko M. D.**

Characteristics of the expression level of MMP-9 and TIMP-1  
in hepatocellular and cholangiocellular liver carcinoma

26 **Bazalytska S. V., Romanenko A. M.**

Histopathological features and protein ubiquitin  
immunohistochemical expression in peritumoral tissue  
of the testicular germ cell tumors

31 **Tertishniy S. I., Voteva W. E.**

Pan cytokeratin expression by meningiomas of the brain

35 **Kuzyk Yu. I.**

Fibromuscular dysplasia of internal carotid artery

39 **Putilin D. A., Kamyshnyi A. M.**

Distribution of FoxP3+regulatory T-cells in rat's pancreatic  
lymph nodes under streptozotocin-induced diabetes  
and metformin administration

44 **Grabovoy A. N., Antoniuk S. A., Silchenko V. P.,  
Vorobiei E. A., Savchin T. M.**

Specific cell's nuclei DNA content and cellular heterogeneity  
of colon adenocarcinoma

48 **Zadorozhna T. D., Podolsky V. V., Parnytska O. I.,  
Eschenko O. I., Kylyhevich S. M., Archakova T. M.,  
Davydova Yu. V., Skrypchenko N. Ya., Grebinychenko G. O.**

Morphological and immunohistochemical peculiarities  
of placental-endometrial structures in women with benign  
and malignant tumors

53 **Bakurova E. M., Buzina R. V., Kondratiuk R. B.,  
Gulkov Yu. K., Vasilenko I. V., Borzenko B. G.**

Thymidine phosphorylase and its possible correlation  
with the lung cancer phenotype features

56 **Hryhorovskiy V. V., Zyma A. M., Guk Yu. M.,  
Mahomedov S., Gayko O. G., Kintchaia-Polishchuk T. A.**

Statistical characteristics and correlations  
of histomorphometric, clinical and biochemical indices  
in systemic therapy in patients with osteogenesis imperfecta

65 **Shchukin D. V., Yakovtsova I. I., Lesovoy V. N., Danyluk S. V.,  
Babich M. N., Tovazhnyanska V. D., Demchenko V. N.**

Immunohistochemical characteristics of renal cell carcinoma  
with intravenous extension

- Ивахно И. В.**  
Диагностическое и прогностическое значение васкуляризации папиллярных микрокарцином щитовидной железы
- Кондратюк Р. Б., Василенко И. В., Гульков Ю. К.**  
Лектино-гистохимическая оценка углеводных детерминант опухолевых клеток основных гистологических типов рака желудка
- Герасимчук М. Р.**  
Прояви експериментального гіпотиреозу при дії помірного фізичного навантаження
- Рикало Н. А., Яровенко Л. О.**  
Особенности репаративной регенерации ткани печени у шурв при экспериментальному тетрахлорметановому та алкогольному гепатиту
- Макарчук А. О.**  
Морфологічна характеристика інволютивних змін епідермісу у хворих із маласезійною інфекцією шкіри обличчя
- Капиштарь А. В.**  
Морфология желчного пузыря у больных острым холециститом, удаленного из минидоступа
- Кузык П. В.**  
Патоморфологічні особливості туберкулом легень (за даними аналізу операційного резекційного матеріалу)
- Лікарю-практику**
- Лискина И. В., Загаба Л. М., Дорофеева С. И.**  
Инфаркт легкого как хирургическая патология: морфология и дифференциальная диагностика
- Ивахно И. В.**  
The diagnostic and prognostic value of vascularization in papillary thyroid microcarcinomas
- 73 Kondratyuk R. B., Vasilenko I. V., Gulkov Yu. K.**  
Lectin-histochemical assessment of carbohydrate determinants in tumour cells of main histological types of gastric cancer
- 80 Gerasymchuk M. R.**  
Manifestations of experimental hypothyroidism during the influence of moderate physical activity
- 84 Rykalo N. A., Yarovenko L. A.**  
Features of reparative regeneration of the liver tissue in rats during experimental tetrachloromethanic and alcoholic hepatitis
- 90 Makarchuk A. O.**  
Morphological characteristics of involutive changes of epidermis in patients with malasseziasis of facial skin
- 95 Kapshitar A. V.**  
Morphology of the ablated gall-bladder from the short-scar incision in patients with acute cholecystitis
- 99 Kuzyk P. V.**  
Pathomorphological features of pulmonary tuberculoma (according to the analysis of operational resection material)
- To a practitioner**
- 102 Liskina I. V., Zagaba L. M., Doropheeva S. I.**  
Pulmonary infarct as surgical pathology: morphology and differential diagnosis
- Пам'яті професора Ступіної Олександрі Семенівни **108** Dedicated to the Memory of Professor Alexandra S. Stupina

## Міжнародна індексація журналу / Indexing

- Ulrich's Periodicals Directory (США)**  
**WorldCat (США):** [http://www.worldcat.org/title/patoloiiia/oclc/260006269&referer=brief\\_results](http://www.worldcat.org/title/patoloiiia/oclc/260006269&referer=brief_results)
- The National Library of Medicine (США):** [http://locatorplus.gov/cgi-bin/Pwebrecon.cgi?v1=1&ti=1,1&Search\\_Arg=Pathologia&Search\\_Code=JALL&SL=None&CNT=25&PID=gATyrKW75IFCFItxUc1ajaR9n&SEQ=20141105025042&SID=3](http://locatorplus.gov/cgi-bin/Pwebrecon.cgi?v1=1&ti=1,1&Search_Arg=Pathologia&Search_Code=JALL&SL=None&CNT=25&PID=gATyrKW75IFCFItxUc1ajaR9n&SEQ=20141105025042&SID=3)
- The National Center for Biotechnology Information:** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/101470944>
- WORLDWIDE ELIBRARY(США):** <http://www.sciary.com/journal-scientific-patology-article-77962>
- getCITED (США):** <http://www.getcited.org/pub/103524559>
- BASE (Bielefeld Academic Search Engine) (ФРН):** <http://www.base-search.net/Search/Results?lookfor=%D0%9F%D0%B0%D1%82%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D1%96%D1%8F&type=all&oaboost=1&ling=1&name=&thes=&refid=dcesde&newsearch=1>
- JournalTOCs (Великобританія):** [http://www.journaltoCs.ac.uk/index.php?action=browse&subAction=pub&publisherID=2830&journalID=29710&pageb=1&userQueryID=&sort=&local\\_page=1&sortType=&sortCol=1](http://www.journaltoCs.ac.uk/index.php?action=browse&subAction=pub&publisherID=2830&journalID=29710&pageb=1&userQueryID=&sort=&local_page=1&sortType=&sortCol=1)
- CiteFactor (США):** [http://www.citefactor.org/journal/index/10492/pathologia#.VDJGUWd\\_smg](http://www.citefactor.org/journal/index/10492/pathologia#.VDJGUWd_smg)
- Index Copernicus (Польща):** <http://www.journals.indexcopernicus.com/masterlist.php?q=%D0%9F%D0%B0%D1%82%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D1%96%D1%8F>
- ROAD (Франція):** [http://road.issn.org/issn/2310-1237-patologia#.VDJG2d\\_smg](http://road.issn.org/issn/2310-1237-patologia#.VDJG2d_smg)
- Research Bible (Японія):** <http://journalseeker.researchbib.com/?action=viewJournalDetails&issn=23068027&uid=r88c07>
- SciTitles (iCubica) (США):** <http://www.scititles.com/journal-articles/24569?page=1>
- Google Scholar (Академія):** [http://scholar.google.com.ua/scholar?q=%D0%B6%D1%83%D1%80%D0%BD%D0%B0%D0%BB+%D0%9F%D0%B0%D1%82%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D1%96%D1%8F%2C+Pathologia&btnG=&hl=ru&as\\_sdt=1%2C5&as\\_ylo=2014&as\\_vis=1](http://scholar.google.com.ua/scholar?q=%D0%B6%D1%83%D1%80%D0%BD%D0%B0%D0%BB+%D0%9F%D0%B0%D1%82%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D1%96%D1%8F%2C+Pathologia&btnG=&hl=ru&as_sdt=1%2C5&as_ylo=2014&as_vis=1)
- DRJI (Індія):** <http://www.drji.org/Publisher/PublisherHome.aspx?msg=Success&uname=2310-1237>
- Open Academic Journals Index (Російська Федерація):** <http://oaji.net/journal-detail.html?number=858>
- InnoSpace (Марокко):** <http://www.sjifactor.inno-space.org/passport.php?id=1556>
- Universal Impact Factor:** <http://www.sjifactor.inno-space.org/passport.php?id=1556>
- РИНЦ (Російська Федерація):** [http://elibrary.ru/title\\_about.asp?id=38052](http://elibrary.ru/title_about.asp?id=38052)
- Киберленінка (Російська Федерація):** <http://cyberleninka.ru/journal/n/patologiya>

УДК 616.12-007.2-07:577.112-053.1

А. В. Каменщик, О. Г. Іванько, А. В. Федченко

## Нуклеарний фактор активованих Т-клітин (NFATc) як можливий діагностичний і прогностичний маркер при клапанних вроджених вадах серця та гіпертрофії міокарда

Запорізький державний медичний університет

**Ключові слова:** вроджені вади серця, гіпертрофія лівого шлуночка, генетичний поліморфізм, фактори транскрипції NFATc.

З метою визначення можливої ролі поліморфізму генів сімейства NFATc у формуванні клапанних вад серця здійснили огляд фахової літератури. Визначили, що експресія генів сімейства нуклеарних факторів активованих Т-клітин (NFATc 1-4) при серцево-судинних порушеннях, які супроводжують як вроджені вади серця (переважно з ураженням клапанів), так і артеріальну гіпертензію, має адаптивний і стрес-індукований щодо відповідних гемодинамічних навантажень характер. Враховуючи, що зазначені протеїни відіграють критичну роль у формуванні серцевих структур і розвитку патологічної гіпертрофії міокарда та судинної стінки, вони разом із сигнальними факторами активації можуть бути доволі перспективними біологічними маркерами під час раннього клінічного прогнозування розвитку серцево-судинних порушень у пацієнтів з окремими вродженими вадами серця (насамперед з аномаліями клапанів) та артеріальною гіпертензією.

### Нуклеарный фактор активированных Т-клеток (NFATc) как возможный диагностический и прогностический маркер при клапанных врожденных пороках сердца и гипертрофии миокарда

А. В. Каменщик, О. Г. Іванько, А. В. Федченко

С целью определения возможной роли полиморфизма генов семейства NFATc в формировании клапанных пороков сердца провели обзор специализированной литературы. Установили, что экспрессия генов семейства нуклеарных факторов активированных Т-клеток (NFATc 1-4) при сердечно-сосудистых нарушениях, сопровождающих как врожденные пороки сердца (преимущественно с поражением клапанов), так и артериальную гипертензию, имеет адаптивный и стресс-индуцированный по соответствующим гемодинамическим нагрузкам характер. Учитывая, что указанные протеины играют критическую роль в формировании сердечных структур и развитии патологической гипертрофии миокарда и сосудистой стенки, они вместе с сигнальными факторами активации могут быть весьма перспективными биологическими маркерами при раннем клиническом прогнозировании развития сердечно-сосудистых нарушений у пациентов с отдельными врожденными пороками сердца (прежде всего с аномалиями клапанов) и артериальной гипертонией.

**Ключевые слова:** врожденные пороки сердца, гипертрофия левого желудочка, генетический полиморфизм, факторы транскрипции NFATc.

*Патология.* – 2015. – №1 (33). – С. 4–7

### Nuclear factor of activated T-cells (NFATc) as a possible diagnostic and prognostic marker in congenital valvular diseases and myocardial hypertrophy

А. В. Каменщик, О. Г. Іванько, А. В. Федченко

**Aim.** The nuclear factor of activated T-cells (NFATc 1-4) family gene expression against the background of cardiovascular disorders, accompanying both congenital heart diseases (mainly ones involving valvular defects) and arterial hypertension, is adaptive and stress-induced by the respective hemodynamic stress.

**Results.** In this regard, given the fact that these proteins play a critical role in both formation of the cardiac structures and, at the same time, development of pathological myocardial and vascular wall hypertrophy, they, along with the signaling activating factors, can be regarded as quite promising biological markers for early clinical prediction of development of the cardiovascular disorders in patients with certain congenital heart diseases (especially with valve anomalies) or hypertension.

**Key words:** Congenital Heart Defects, Left Ventricular Hypertrophy, Genetic Polymorphism, NFATc Transcription Factors.

*Pathologia.* 2015; №1 (33): 4–7

Вроджені вади серця (ВВС) у дітей останнім часом привертають увагу медичної спільноти. Постійне збільшення захворюваності може бути пов'язане як із впливом довкілля та збільшенням відповідної генотоксичної дії, так і з поширенням внутрішньоутробних інфекцій із відповідним впливом на геном під час формування серцевих структур. Водночас у загальній структурі ВВС відзначають збільшення кількості серцевих вад, що супроводжуються клапанними аномаліями, а, як відомо, наслідки цих вад, зокрема гострі серцево-судинні події, виникають переважно у дорослому віці. Так, за даними

Benson D. Woodrow [1], цитомегаловірусна інфекція робить суттєвий внесок у розвиток як ВВС, так і інших аномалій розвитку в дітей із частотою від 4 до 50 на 1000 пологів та від 4 до 10 на 1000 народжених живими дітей із рівнем діагностики 40% на першому році життя. Однак, наприклад, двостулковий клапан аорти, що є найбільш поширеною вродженою вагою клапанів серця, при цьому не враховується, хоча й характеризується найбільшою захворюваністю і смертністю в уражених осіб і має поширеність від 10 до 20 випадків на 1000 населення [2].

Слід також відзначити, що багато досліджень та оглядів засвідчують генетичне походження вроджених вад серця та роль окремих генів і компаундів у їх формуванні. Формування клапанів серця відбувається в ембріональний період внутрішньоутробного розвитку дитини на 3–5 тижні гестації [3,4]. Визначення місця формування серцевих клапанів у серці ембріона потребує певної активації сигнальних шляхів, що починається з активації так званого міокардіального каркасного морфогенетичного протеїну 2 (Vmp2) й надалі активації гена іншої сигнальної молекули – Tbx2 [5]. Водночас за межами зони формування клапанів кардіогенні сигнальні шляхи активують іншу сигнальну молекулу Tbx20, що послідовно активує Neu1 та Neu2 та, відповідно, пригнічує Tbx2. Отже, гени сигнальних молекул Tbx20, Neu1 та Neu2 пригнічують активацію Vmp2 та Tbx2 в зоні формування серцевих клапанів [6]. В ендокарді фактор Notch1 також пригнічує Vmp2 за участі Neu1 та Neu2. Одночасно фактор NeuL визначає ендотеліальну ділянку в ендокарді атріовентрикулярного каналу, що є компетентною до формування тканини клапанів серця [7].

Останнім часом сигнальні шляхи, які контролюють розвиток ендокардіального ендотелію, доволі докладно вивчили [8]. Встановили, що ці процеси індуються за допомогою інтегративного ланцюга за участю трансформуючого чинника росту (TGF)- $\beta$  та гена сигнального фактора Notch [9]. Визначили, що нуклеарний фактор активованих Т-клітин 1 (NFATC1) активується чинником росту ендотелію судин (VEGF) і регулює відповідну ендотеліально-мезенхімальну трансформацію, підтримує ендокардіальну проліферацію й наступне видовження стулок клапанів серця [10,24].

Отже, генетична регуляція морфогенезу клапанів серця є консервативним, складним, високоорганізованим у часі та просторі процесом. Як десинхронізація, так і порушення функціональної інтеграції в каскаді названих ланцюгових взаємодій під час формування серцевих клапанів призводять до відповідних аномалій розвитку серцевих структур у пацієнтів із вродженими вадами серця [11].

#### Мета роботи

На основі відомостей сучасної фахової літератури простежити можливу роль поліморфізму генів сімейства NFATC у формуванні клапанних вад серця.

Нині відомі 5 членів групи NFATC, що характеризуються еволюційно-консервативним ДНК-з'єднувальним доменом, що складається приблизно з 300 амінокислотних залишків. Завдяки контролю Са-кальмодулін-залежною протеїн-фосфатазою (кальціневрином) щонайменше 5 NFATC протеїнів можна вважати чинниками транскрипції з дещо різними властивостями [12]. Уперше ці фактори (NFATc1-NFATc4) ідентифіковані в лімфоцитах як нуклеарний комплекс, що приєднується до промотора інтерлейкіну-2 та відіграє ключову роль в індукційній експресії генів активованих Т-клітин.

Виявлено, що продукція NFATc5 регулюється тільки осмотичним стресом. Слід також відзначити, що експре-

сія NFAT протеїнів не обмежується лише Т-клітинами, а встановлена також у багатьох як імунних, так і неімунних клітинах, де вони переважно регулюють швидку активацію генів у високодиференційованих тканинах. Найвищу активність NFAT протеїнів зафіксували у хондроцитах, міоцитах, адипоцитах, кератиноцитах, ендотеліальних клітинах під час диференціації та розвитку клапанів серця та судин, гіпертрофічних реакціях кісток і серцевих м'язів [13,14].

Виявили деякі клінічні фенотипи, що пов'язані з поліморфізмами NFAT протеїнів. Так, встановили значущу кореляцію між трьома поліморфізмами гена NFATc1 (rs7240256, rs11665469, rs754505) і виникненням дефекту міжшлуночкової перетинки (ДМШП) серця в одній китайській популяції [15]. При дослідженні 7 регіону в екзоні гена NFATc1 визначили 2 ділянки, що траплялись у 58% пацієнтів із ВВС та у 74% їхніх здорових батьків і сибсів. Гомозиготні форми відповідних алелей встановили у 2 із 24 хворих із ДМШП, 3 із 18 осіб, які мали дефект міжпередсердної перетинки (ДМП), а також в 1 із 4 пацієнтів із двостулковим клапаном аорти; при інших ВВС названі поліморфізми не відзначали [16,17].

У деяких дослідженнях доведена роль NFATC протеїнів у розвитку серцевої дисфункції та патологічної гіпертрофії міокарда. Показано, що всі 4 кальціневрин-залежні ізоформи знаходяться в активному стані в міокарді пацієнтів з аортальним стенозом, але попередня активація NFAT шляхом перевантаження тиском зникає після припинення відповідної стимуляції. Механічним сенсором у міокарді, що активує NFAT-протеїни, є синдекан-4. Ангіотензин-2 здатен активувати NFATc1 і NFATc4, а норепінефрин, відповідно, – NFATc1 й NFATc2 [18–21]. На мишачій моделі виявили, що цитоскелетний протеїн анексин А7 (AnpA7), який взаємодіє з Са (2+), незважаючи на функціональну недостатність, суттєво підвищує нуклеарну локалізацію NFATc1 та його транскрипційну активність у міокарді як у контролі, так і після бета-адренергічної стимуляції ізопротеренолом, що підкреслює важливу роль анексину А7 і NFAT-протеїнів у гіпертрофічній відповіді в умовах кардіального стресу [22].

В іншому дослідженні встановлено, що наявність поліморфізму із заміною гліцину на аланін у 160 позиції NFATc4-протеїну (G160A) асоційована зі збільшенням маси та потовщенням стінки міокарда лівого шлуночка [23].

Відзначимо, що нині доведена роль поліморфізмів NFATc4 у формуванні патологічної асиметричної гіпертрофії міокарда у спортсменів. Так, отримані вірогідно більші частоти в розподілі алелей гена NFATc4 (Gly160Ala поліморфізм) у підгрупах спортсменів із гіпертрофією міокарда та значущі кореляції названих алелей із товщиною задньої стінки лівого шлуночка в діастолі, а також більші частоти у спортсменів із товщиною задньої стінки лівого шлуночка понад 12 мм та інверсією зубця Т [25,26].

Протягом експериментальних досліджень доведено, що ендотелін-1 є прямим активатором NFATc3 в умовах хронічної гіпоксії з наступною гіпертрофією гладких

м'язів судин, потовщенням судинної стінки та гіпертензією [27,28]. Під час клініко-генетичних досліджень виявили асоціації з рівнями артеріального тиску алеля rs 7149586 гена NFATc4 у жінок і rs 1955915 у чоловіків [29].

### Висновки

Аналіз фахової літератури дає можливість зробити висновок, що експресія генів сімейства нуклеарних факторів активованих Т-клітин (NFATc 1-4) при серцево-судинних порушеннях, які супроводжують як вроджені вади серця (переважно з ураженням клапанів), так і артеріальну гіпертензію, має адаптивний і

стрес-індукований щодо відповідних гемодинамічних навантажень характер.

Враховуючи, що названі протеїни відіграють критичну роль як у формуванні серцевих структур, так і розвитку патологічної гіпертрофії міокарда та судинної стінки, вони разом із сигнальними факторами активації можуть бути доволі перспективними біологічними маркерами протягом раннього клінічного прогнозування розвитку серцево-судинних порушень у пацієнтів з окремими вродженими вадами серця (насамперед з аномаліями клапанів) та артеріальною гіпертензією.

### Список літератури

- Benson D.W. Genetic Origins of Pediatric Heart Disease / D.W. Benson // *Pediatr. Cardiol.* – 2010. – №31. – P. 422–429.
- Outcomes in Adults With Bicuspid Aortic Valves / N. Tzemos, J. Therrien, J. Yip, et al. // *JAMA.* – 2008. – Vol. 300(11). – P. 1317–1325.
- Lack of primary cilia primes shear-induced endothelial-to-mesenchymal transition / A.D. Egorova, P.P. Khedoe, M.J. Goumans, et al. // *Circ. Res.* – 2011. – №108. – P. 1093–1101.
- Pompa J.L. Coordinating tissue interactions: Notch signaling in cardiac development and disease / J.L. Pompa, J.A. Epstein // *Dev Cell.* – 2012. – №22. – P. 244–254.
- Expression of chick Tbx-2, Tbx-3, and Tbx-5 genes during early heart development: Evidence for BMP2 induction of Tbx2 / M. Yamada, J.P. Revelli, G. Eichele, et al. // *Dev Biol.* – 2000. – №228. – P. 95–105.
- Tbx20 is essential for cardiac chamber differentiation and repression of Tbx2 / M.K. Singh, V.M. Christoffels, J.M. Dias, et al. // *Development.* – 2005. – №132. – P. 2697–2707.
- Integration of a Notch-dependent mesenchymal gene program and Bmp2-driven cell invasiveness regulates murine cardiac valve formation / L. Luna Zurita, B. Prados, J. Greg Bessa, et al. // *J Clin Invest.* – 2010. – №120. – P. 3493–3507.
- Lim J. Epithelial-mesenchymal transitions: Insights from development / J. Lim, J.P. Thiery // *Development.* – 2012. – №139. – P. 3471–3486.
- TGF- $\beta$  and BMP signaling in cardiac cushion formation: Lessons from mice and chicken / B.P. Kruithof, S.N. Duim, A.T. Moerkamp, M.J. Goumans // *Differentiation.* – 2012. – №84. – P. 89–102.
- Partitioning the heart: Mechanisms of cardiac septation and valve development / C.J. Lin, C.Y. Lin, C.H. Chen, B. Zhou, C.P. Chang // *Development.* – 2012. – №139. – P. 3277–3299.
- Srivastava D. Making or breaking the heart: From lineage determination to morphogenesis / D. Srivastava // *Cell.* – 2006. – №126. – P. 1037–1048.
- NFATc1/ $\alpha$ A: The other Face of NFAT Factors in Lymphocytes / E. Serfling, A. Avots, S. Klein-Hessling, et al. // *Cell Communication and Signaling.* – 2012. – №10. – P. 16.
- Expression and regulation of NFAT (nuclear factors of activated T cells) in human CD34 cells: down-regulation upon myeloid differentiation / A. Kiani, I. Habermann, M. Haase, et al. // *Journal of Leukocyte Biology.* – 2004. – Vol. 76. – №5. – P. 1057–1065.
- Macian F. Nfat proteins: key regulators of T-cell development and function / F. Macian // *Nature reviews. Immunology.* – 2005. – Vol. 5. – P. 472–484.
- Association of NFATc1 gene polymorphism with ventricular septal defect in the Chinese Han population / L. Shen, Z.Z. Li, A.D. Shen, et al. // *Chin Med J (Engl).* – 2013. – №126(1). – P. 78–81.
- Zhi B.Z. Association between nuclear factor of activated T cells 1 gene mutation and simple congenital heart disease in children / B.Z. Zhi // *Chin Med. J.* – 2010. – №38(7). – P. 621–624.
- High-resolution analysis of copy number variants in adults with simple-to-moderate congenital heart disease / W. Zhao,

- G. Niu, B. Shen, et al. // *Am J Med. Genet A.* – 2013. – №161A(12). – P. 3087–3094.
- Lunde I.G. Molecular mechanisms of heart failure: Nuclear Factor of Activated T-cell (NFAT) signaling in myocardial hypertrophy and dysfunction: dissertation for the degree of Philosophiae Doctor (PhD) / I.G. Lunde // Series of dissertations submitted to the Faculty of Medicine, University of Oslo. – 2011. – №1307.
- Kehat I. Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation / I. Kehat, J.D. Molkentin // *Circulation.* – 2010. – №122. – P. 2727–2735.
- Regression of pressure-induced left ventricular hypertrophy is characterized by a distinct gene expression profile / W.E. Stansfield, P.C. Charles, R.H. Tang, et al. // *J Thorac Cardiovasc. Surg.* – 2009. – №137. – P. 232–238.
- Serumsyndecan-4 is a novel biomarker for patients with chronic heart failure / R. Takahashi, K. Negishi, A. Watanabe, et al. // *J Cardiol.* – 2011. – №57. – P. 325–332.
- Annexin A7 deficiency potentiates cardiac NFAT activity promoting hypertrophic signaling / J. Voelkl, I. Alesutan, T. Pakladok, et al. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2014. – №445(1). – P. 244–249.
- Polymorphisms of genes of the cardiac calcineurin pathway and cardiac hypertrophy / O. Poirier, V. Nicaud, T. McDonagh, et al. // *FEur J Hum Genet.* – 2003. – №11(9). – P. 659–664.
- Bingruo W. Nfatc1 directs the endocardial progenitor cells to make heart valve primordium / W. Bingruo, H.S. Baldwin, B. Zhou // *Trends in Cardiovascular Medicine.* – 2013. – Vol. 23. – P. 294–300.
- Клинико-генетические аспекты формирования «патологического спортивного сердца» у высококвалифицированных спортсменов / А.Г. Федотова, И.В. Астратенкова, Е.В. Линде и др. // *Вестник спортивной науки.* – 2009. – №2. – С. 32–37.
- Влияние полиморфизмов генов ACE, PPARA, PPARD и NFATC4 на клинико-функциональные характеристики «спортивного сердца» / Е.В. Линде, И.И. Ахметов, З.Г. Орджоникидзе и др. // *Международный журнал интервенционной кардиологии.* – 2009. – №17. – С. 50–56.
- NFATc3 contributes to intermittent hypoxia-induced arterial remodeling in mice / S. Frutos, E. Caldwell, C.H. Nitta, et al. // *Am J Physiol Heart Circ. Physiol.* – 2010. – №299(2). – P. 356–363.
- NFATc3 is required for intermittent hypoxia-induced hypertension / S. Frutos, L. Duling, D. Alò, et al. // *Am J Physiol Heart Circ. Physiol.* – 2008. – №294(5). – P. 2382–2390.
- Половкова О.Г. Роль генов сигнального пути кальцинеурина в развитии ремоделирования миокарда у больных ишемической болезнью сердца : автореф. дис. на соискание ученой степени к.мед.н. / О.Г. Половкова. – Томск, 2013. – 23 с.

### References

- Benson, D. Woodrow. (2010) Genetic Origins of Pediatric Heart Disease. *Pediatr. Cardiol.*, 31, 422–429. doi: 10.1007/s00246-009-9607-y.
- Tzemos, N., Therrien, J., Yip, J., Thanassoulis, G., Tremblay, S., Jamorski, M. T., et al. (2008) Outcomes in Adults With

- Bicuspid Aortic Valves. *JAMA*, 300(11), 1317–1325. doi: 10.1001/jama.300.11.1317.
3. Egorova, A. D., Khedoe, P. P., Goumans, M. J., Yoder, B. K., Nauli, S. M., Dijke, P., et al. (2011) Lack of primary cilia primes shear-induced endothelial-to-mesenchymal transition. *Circ. Res.*, 108, 1093–1101. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.231860.
  4. Pompa, J. L., & Epstein, J. A. (2012) Coordinating tissue interactions: Notch signaling in cardiac development and disease. *Dev Cell.*, 22, 244–254. doi: 10.1016/j.devcel.2012.01.014.
  5. Yamada M., Revelli, J. P., Eichele, G., Barron, M., & Schwartz, R. J. (2000) Expression of chick Tbx-2, Tbx-3, and Tbx-5 genes during early heart development: Evidence for BMP2 induction of Tbx2. *Dev Biol.*, 228, 95–105. doi:10.1006/dbio.2000.9927.
  6. Singh, M. K., Christoffels, V. M., Dias, J. M., Trowe, M. O., Petry, M., Schuster-Gossler, K., et al. (2005) Tbx20 is essential for cardiac chamber differentiation and repression of Tbx2. *Development*, 132, 2697–2707.
  7. LunaZurita, L., Prados, B., GregBessa, J., Luxan, G., delMonte, G., Benguria, A., et al. (2010) Integration of a Notch-dependent mesenchymal gene program and Bmp2-driven cell invasiveness regulates murine cardiac valve formation. *J Clin Invest*, 120, 3493–3507. doi: 10.1172/JCI42666.
  8. Lim, J., & Thiery, J. P. (2012) Epithelial-mesenchymal transitions: Insights from development. *Development*, 139, 3471–3486. doi: 10.1242/dev.071209.
  9. Kruithof, B. P., Duim, S. N., Moerkamp, A. T., & Goumans, M. J. (2012) TGF- $\beta$  and BMP signaling in cardiac cushion formation: Lessons from mice and chicken. *Differentiation*, 84, 89–102. doi:10.1016/j.diff.2012.04.003.
  10. Lin, C. J., Lin, C. Y., Chen, C. H., Zhou, B., & Chang, C.P. (2012) Partitioning the heart: Mechanisms of cardiac septation and valve development. *Development*, 139, 3277–3299. doi: 10.1242/dev.063495.
  11. Srivastava, D. (2006) Making or breaking the heart: From lineage determination to morphogenesis. *Cell*, 126, 1037–1048. doi:10.1016/j.cell.2006.09.003.
  12. Serfling, E., Avots, A., Klein-Hessling, S., Rudolf, R., Vaeth, M., & Berberich-Siebelt, F. (2012) NFATc1/ $\alpha$ A: The other Face of NFAT Factors in Lymphocytes. *Cell Communication and Signaling*, 10, 16. doi: 10.1186/1478-811X-10-16.
  13. Kiani, A., Habermann, I., Haase, M., Feldmann, S., Boxberger, S., Sanchez-Fernandez, M., et al. (2004) Expression and regulation of NFAT (nuclear factors of activated T cells) in human CD34 cells: down-regulation upon myeloid differentiation. *Journal of Leukocyte Biology*, 76(5), 1057–1065.
  14. Macian, F. (2005) Nfat proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nature reviews. Immunology*, 5, 472–484.
  15. Shen, L., Li, Z. Z., Shen, A. D., Liu, H., Bai, S., Guo, J., et al. (2013) Association of NFATc1 gene polymorphism with ventricular septal defect in the Chinese Han population. *Chin Med J (Engl)*, 126(1), 78–81.
  16. Zhi, B. Z. (2010) Association between nuclear factor of activated T cells 1 gene mutation and simple congenital heart disease in children. *Chin Med. J.*, 38(7), 621–624.
  17. Zhao, W., Niu, G., Shen, B., Zheng, Y., Gong, F., Wang, X., et al. (2013) High-resolution analysis of copy number variants in adults with simple-to-moderate congenital heart disease. *Am J Med. Genet A*, 161A(12), 3087–3094. doi: 10.1002/ajmg.a.36177.
  18. Lunde, I. G. (2011) Molecular mechanisms of heart failure: Nuclear Factor of Activated T-cell (NFAT) signaling in myocardial hypertrophy and dysfunction: dissertation for the degree of Philosophiae Doctor (PhD). *Series of dissertations submitted to the Faculty of Medicine, University of Oslo*, 1307.
  19. Kehat, I., & Molkenkin, J. D. (2010) Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation. *Circulation*, 122, 2727–2735. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.942268.
  20. Stansfield, W. E., Charles, P. C., Tang, R. H., Rojas, M., Bhati, R., Moss, N. C., et al. (2009) Regression of pressure-induced left ventricular hypertrophy is characterized by a distinct gene expression profile. *J Thorac Cardiovasc. Surg.*, 137, 232–238. doi: 10.1016/j.jtcvs.2008.08.019.
  21. Takahashi, R., Negishi, K., Watanabe, A., Arai, M., Naganuma, F., Ohyama, Y., & Kurabayash, M. (2011) Serumsyndecan-4 is a novel biomarker for patients with chronic heart failure. *J Cardiol*, 57, 325–332. doi: 10.1016/j.jcc.2011.01.012.
  22. Voelkl, J., Alesutan, I., Pakladok, T., Viereck, R., Feger, M., Mia, S., et al. (2014) Annexin A7 deficiency potentiates cardiac NFAT activity promoting hypertrophic signaling. *J Biochem Biophys Res Commun*, 445(1), 244–249. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.01.186.
  23. Poirier, O., Nicaud, V., McDonagh, T., Dargie, H. J., Desnos, M., Dorent, R., et al. (2003) Polymorphisms of genes of the cardiac calcineurin pathway and cardiac hypertrophy. *FEur J Hum Genet*, 11(9), 659–664.
  24. Bingruo, W., Baldwin, H.S., & Zhou, B. (2013) Nfatc1 directs the endocardial progenitor cells to make heart valve primordium. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 23, 294–300. doi: 10.1016/j.tem.2013.04.003.
  25. Linde, E. V., Ahmetov, I. I., Orjonikidze, Z. Y., Asratenkova, I. V., & Fedotova, A. G. (2009) Kliniko-genealogicheskie aspekty formirovaniya «patologicheskogo sportivnogo serdtsa» u vysoko-kvalifitsirovannykh sportsmenov [Clinical and genetic aspects for «pathologic sport heart» pathogenesis in elite athletes]. *Vestnik sportivnoy nauki*, 2, 32–37. [in Russian].
  26. Linde, E. V., Ahmetov, I. I., Orjonikidze, Z. Y., Asratenkova, I. V., & Fedotova, A. G. (2009) Vliyanie polimorfizmof genov ACE, PPARA, PPARD i NFATC4 na kliniko-funktsionalnye kharakteristiki «sportivnogo serdtsa» [Influence of polymorphisms of ACE RRARA, PPARD and NFATC4 on clinical and functional characteristics of the «athlete's heart»]. *Mezhdunarodnyy zhurnal intervensionnoy kardiologii*, 17, 50–56. [in Russian].
  27. Frutos, S., Caldwell, E., Nitta, C. H., Kanagy, N. L., Wang, J., Wang, W., et al. (2010) NFATc3 contributes to intermittent hypoxia-induced arterial remodeling in mice. *Am J Physiol Heart Circ. Physiol*, 299(2), 356–363. doi: 10.1152/ajpheart.00341.2010.
  28. Frutos, S., Duling, L., Alò, D., Berry, T., Jackson-Weaver, O., Walker, M., et al. (2008) NFATc3 is required for intermittent hypoxia-induced hypertension. *Am J Physiol Heart Circ. Physiol*, 294(5), 2382–2390. doi: 10.1152/ajpheart.00132.2008.
  29. Polovkova, O. G. (2013) *Rol` genov signal`nogo puti kalcineurina v razvitti remodelirovaniya miokarda u bolnykh ishemicheskoy bolezni u serdtsa* (Avtoref. dis...kand. med. nauk). [Role of calcineurin signaling pathway genes in the development of myocardial remodeling in patients with coronary heart disease] (Extended abstract of candidate's thesis). Tomsk [in Russian].

**Відомості про авторів:**

Каменщик А.В., к. мед. н., асистент каф. госпітальної педіатрії, Запорізький державний медичний університет, E-mail: kamenshchyk@mail.ru.  
 Іванько О.Г., д. мед. н., професор, зав. каф. пропедевтики дитячих хвороб, Запорізький державний медичний університет.  
 Федченко А.В., аспірант, асистент каф. пропедевтики дитячих хвороб, Запорізький державний медичний університет.

**Сведения об авторах:**

Каменщик А.В., к. мед. н., асистент каф. госпітальной педиатрии, Запорожский государственный медицинский университет, E-mail: kamenshchyk@mail.ru.

Иванько О.Г., д. мед. н., профессор, зав. каф. пропедевтики детских болезней, Запорожский государственный медицинский университет.  
 Федченко А.В., аспирант, ассистент каф. пропедевтики детских болезней, Запорожский государственный медицинский университет.

**Information about authors:**

Kamenshchyk A.V., MD, PhD, Assistant of the Department of Hospital Pediatrics, Zaporizhzhia State Medical University, E-mail: kamenshchyk@mail.ru.  
 Ivanko O.G., MD, PhD, DSci, Head of the Department of Propedeutics of Children Diseases, Zaporizhzhia State Medical University.  
 Fedchenko A.V., Postgraduate student, Assistant of the Department of Propedeutics of Children Diseases, Zaporizhzhia State Medical University.

Надійшла в редакцію 23.03.2015 р.

О. Г. Родинський, Ю. В. Козлова, Л. В. Гузь

## Динаміка патологічних змін структури міокарда щурів за умов введення доксорубіцину

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»

**Ключові слова:** доксорубіцин, міокард, щури.

У зв'язку з високою кардіотоксичністю доксорубіцин використовують для дослідження патогенезу серцевої недостатності. З метою вивчення динаміки патологічних змін серця в експерименті в 60 щурів із доксорубіциновою кардіоміопатією та в 60 щурів контрольної групи досліджували електрокардіографічні, патоморфологічні та патогістологічні зміни міокарда. Встановили, що незворотні ушкодження міокарда, які простежили в динаміці, а саме деструктивно-дегенеративні зміни кардіоміоцитів із втратою ними спеціалізованих ознак унаслідок дії доксорубіцину мають не тільки локальний, але й дифузний характер. Маркерами цих змін у функціональному аспекті є порушення автоматизму, провідності серця та серцева недостатність, що швидко прогресує.

### Динамика патологических изменений структур миокарда крыс в условиях введения доксорубицина

А. Г. Родинский, Ю. В. Козлова, Л. В. Гузь

В связи с высокой кардиотоксичностью доксорубицин используют для исследования патогенеза сердечной недостаточности. С целью изучения динамики патологических изменений сердца в эксперименте у 60 крыс с доксорубициновой кардиомиопатией и у 60 крыс контрольной группы исследовали электрокардиографические, патоморфологические и патогистологические изменения миокарда. Установлено, что необратимые повреждения миокарда, прослеженные в динамике, а именно деструктивно-дегенеративные изменения кардиомиоцитов с потерей ими специализированных признаков в результате действия доксорубицина имеют не только локальный, но и диффузный характер. Маркерами этих изменений в функциональном аспекте являются нарушение автоматизма, проводимости сердца и быстро прогрессирующая сердечная недостаточность.

**Ключевые слова:** доксорубицин, миокард, крысы.**Патология.** – 2015. – №1 (33). – С. 8–11

### Dynamics of pathological changes of myocardial structures of rats under administration of doxorubicin

A. G. Rodinskij, Ju. V. Kozlova, L. V. Guz'

Due to the high cardiotoxicity of doxorubicin it is used to study pathogenesis of heart failure.

Aim. In order to study the dynamics of pathological changes of the heart in the experiment, ECG, pathological and histopathological changes in the myocardium were investigated in 60 rats with doxorubicin cardiomyopathy and 60 rats in the control group.

Methods and results. We found that irreversible myocardial damage, established by us in the dynamics, namely destructive and degenerative changes of cardiomyocytes with the loss of their special characteristics, as a result of doxorubicin effect are not only local, but also diffuse, markers of which are the violation of the functional aspect of automaticity, conduction of the heart and rapidly progressive heart failure.

**Key words:** Doxorubicin, Myocardium, Rats.**Pathologia.** 2015; №1 (33): 8–11

Відомо про високу кардіотоксичність антрациклінового антибіотика доксорубіцину (Д), який широко застосовують для лікування злоякісних новоутворень [3,8]. У зв'язку із цим антрациклінові антибіотики викликали великий інтерес дослідників для вивчення патогенезу серцевої недостатності [9]. Розвиток антрациклінової кардіоміопатії базується на дегенеративно-дистрофічних змінах кардіоміоцитів, які, на думку багатьох дослідників, мають неспецифічний характер [5]. Незважаючи на те, що патологічні явища в міокарді описані доволі докладно, у фаховій літературі наявні різні погляди щодо їхньої локалізації, поширеності, динаміки та зв'язків із функціональними характеристиками серця [1].

#### Мета роботи

Дослідження динаміки патологічних змін структур серця за умов експериментальної доксорубіцинової кардіоміопатії.

#### Матеріали і методи дослідження

Дослідження здійснили на 120 щурах-самцях лінії Вістар віком 6–8 місяців і вагою 180–220 г. Тварин поділили на 2 групи: контрольну (n=60) та експериментальну (n=60). Кардіоміопатію моделювали шляхом внутрішньоочеревинного 5-кратного з інтервалом в 1 тиждень введення розчину доксорубіцину із розрахунку 5 мг/кг [2]. Тваринам контрольної групи внутрішньоочеревинно вводили 0,9% розчин NaCl у відповідні терміни [6]. Усі досліди виконали на 1, 7, 14, 21 та 28 добу після завершення введення доксорубіцину.

У визначені терміни спостереження щурам виконували електрокардіографічне (ЕКГ) дослідження з наступним виведенням з експерименту шляхом передозування розчином тіопенталу. В евтаназованих тварин вилучали серце для патоморфологічного дослідження. Після встановлення лінійно-вагових характеристик (довжина,



## Лінійно-вагові характеристики сердець щурів у динаміці розвитку доксорубіцинової кардіоміопатії

Показники	Вага серця, мг	Довжина серця, мм	Ширина серця, мм	Товщина серця, мм	Товщина ЛШ, мм	Товщина ПШ, мм
Контроль	1052,0±83,4	17,2±0,4	11,2±0,7	8,2±0,7	3,1±0,2	0,96±0,05
1 доба Д	1432,0±96,3*	18,4±0,4*	13,6±0,6*	10,2±0,7*	3,9±0,3*	1,08±0,06
7 доба Д	1416,0±98,5*	18,0±0,4	12,8±0,7*	10,4±0,4*	3,9±0,2*	1,08±0,04
14 доба Д	1374,0±86,6*	17,4±0,2	12,2±0,8*	10,0±0,3*	3,7±0,2*	1,04±0,02
21 доба Д	1403,0±61,8*	17,9±0,3	12,9±0,5*	10,1±0,4*	3,8±0,2*	1,06±0,03
28 доба Д	1395,0±62,2*	17,7±0,3	12,5±0,5*	10,2±0,2*	3,8±0,1*	1,06±0,02

Примітка: \* – вірогідні відмінності між контрольною та експериментальною групами тварин при  $p \leq 0,05$ .

ширина, товщина (мм) та вага (мг) серця) здійснювали розтин порожнин «за током крові» та вимірювали в середній третині шлуночків товщину стінок. Після цього за стандартною методикою виконали патогістологічне дослідження із забарвленням мікроскопічних зрізів гематоксилін-еозином [4].

Усі експерименти виконали згідно з міжнародними вимогами та нормами гуманного ставлення до тварин (Конвенція Ради Європи від 18.03.1986 р.; Закон України від 21.02.2006 р. №3447-IV), що затверджено на засіданні комісії з питань біомедичної етики ДЗ «ДМА МОЗ України» (протокол № 5 від 01.04.2013 р.).

Статистично результати опрацювали з урахуванням критерію Стюдента. Вірогідними вважали відмінності середніх арифметичних при  $p \leq 0,05$  [6].

#### Результати та їх обговорення

Для визначення динаміки патологічних змін доксорубіцинової кардіоміопатії перед виведенням з експерименту у тварин реєстрували ЕКГ. Протягом цього дослідження у групі щурів із доксорубіциновою кардіоміопатією на всіх термінах спостереження виявили порушення автоматизму: сповільнення скорочень серця (брадикардія), порушення провідності, зокрема передсердно-шлуночкової блокади I ступеня з вірогідним подовженням інтервалу P-Q й повні поперекові блокади. Крім цих змін майже в усіх експериментальних тварин на ЕКГ фіксували зміщення сегмента S-T і подовження Q-T та S-T інтервалів, що також свідчить про електричну нестабільність.

Порівнюючи кардіометричні параметри, встановили вірогідне збільшення лінійних і вагових величин сердець після введення доксорубіцину (табл. 1).

Проаналізувавши результати, відзначили, що різке (в порівнянні з контролем) збільшення ваги, довжини, ширини, товщини серця та товщини стінки лівого шлуночка відбувається на 1 добу після останнього введення Д. Це пов'язано з набряком міокарда, який розвинувся в результаті гострого запалення. Надалі запальний процес згасав. Про це свідчить поступове зменшення лінійно-вагових характеристик міокарда (табл. 1).

Про ознаки запалення свідчили й дані патогістологічного дослідження. Так, дослідження структури міокарда лівого шлуночка (ЛШ) сердець щурів експериментальної групи на 1 добу спостереження показали наявність у всіх шарах вогнищевих і дифузних ділянок із деструктивно-некротичними змінами в кардіоміоцитах, навколо яких виявили значні поля клітинної інфільтрації (рис. 1).

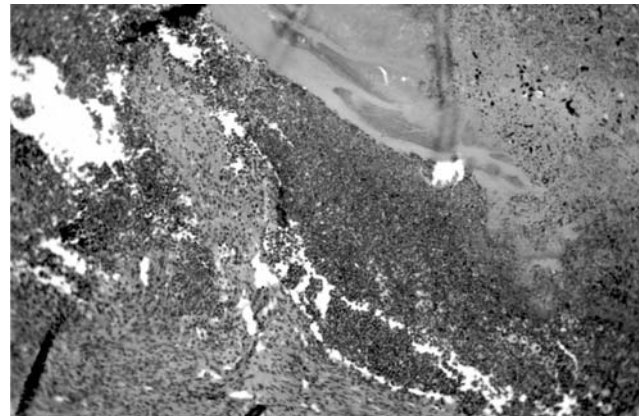


Рис. 1. Гістологічний зріз міокарда ЛШ щура на 1 добу. Забарвлення гематоксилін-еозином.  $36 \times 100$ .

Поряд зі структурними змінами були різко виражені гемодинамічні розлади переважно у вигляді нерівномірного кровонаповнення артеріальних, венозних судин вінцевої системи та місцями зі стазами переважно в капілярній ланці.

У наступних термінах спостереження (на 7 та 14 добу) зберігалися вогнищеві ділянки міжм'язових крововиливів та явища стромального набряку (рис. 2). Навколо некротичних ділянок спостерігали скупчення лейкоцитарно-лімфогістіоцитарних інфільтратів (рис. 2).

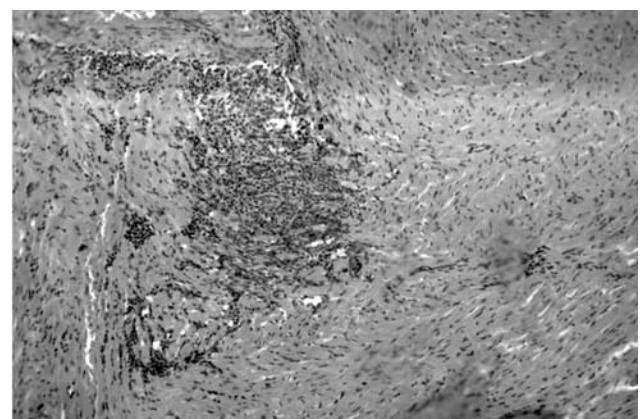


Рис. 2. Гістологічний зріз міокарда ЛШ щура на 7 добу після початку експерименту. Забарвлення гематоксилін-еозином.  $36 \times 100$ .

На 21 і 28 добу експерименту виявили значне зменшення інтерстиціального набряку, вздовж ділянок демаркацій з'являлися пухккі сполучнотканинні тяжі

(рис. 3). На місцях лейкоцитарного детриту виявили темно-фіолетові включення неправильної форми, що може вказувати на відкладання кальцію. Характерні особливості на цих етапах дослідження – виявлення в усіх полях зору кардіоміоцитів з явищами гідропічної дистрофії (рис. 3).

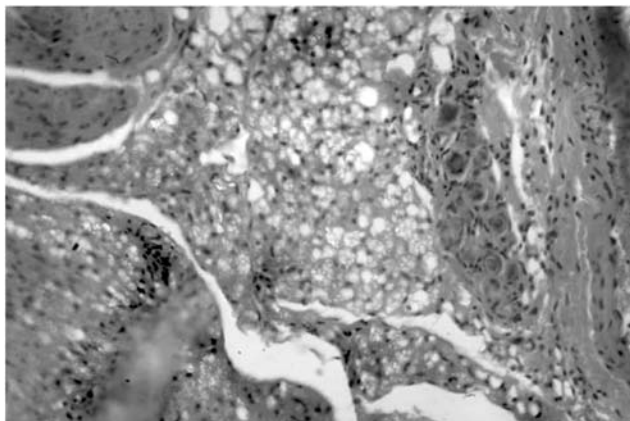


Рис. 3. Гістологічний зріз міокарда ЛШ щура на 28 добу після початку експерименту. Забарвлення гематоксилін-еозином. 36. ×200.

Патологічні зміни в серці, котрі виявили та простежили протягом 4 тижнів після останнього введення доxorubicину, підтвердили з використанням функціональних

і морфологічних методів дослідження. Вони свідчили про розвиток у міокарді незворотних явищ зі швидким прогресуванням.

#### Висновки

1. У ранні терміни дослідження, а саме на 1–14 добу виявили такі патологічні явища, як набряк і некротичні зміни кардіоміоцитів з ознаками значної клітинної інфільтрації. У пізні терміни (21–28 доба) домінували репаративні процеси з дистрофічними змінами кардіоміоцитів.
2. Аналіз лінійно-вагових характеристик серця в щурів експериментальної групи показав збільшення ваги, довжини, ширини, товщини серця й окремо правого та лівого шлуночків, що спостерігали в усі терміни спостереження.
3. Незворотні ушкодження міокарда внаслідок дії доxorubicину, які простежили в динаміці, мають не тільки локальний, але й дифузний характер. Маркерами цих змін у функціональному аспекті є порушення автоматизму, провідності серця та серцевої недостатності, що швидко прогресує.

**Перспективи подальших досліджень** полягають у вивченні змін функцій головного мозку в динаміці розвитку порушень міокарда, що відбуваються при введенні доxorubicину.

#### Список літератури

1. Вплив рубоміцину гідрохлориду на показники гемодинаміки у кролів / І.С. Чекман, Н.О. Горчакова, І.В. Ніженківська та ін. // Ліки. – 2003. – №5–6. – С. 88–89.
2. Доклинические исследования лекарственных средств: методические рекомендации / под. ред. А.В. Стефанова. – К.: Авиценна, 2002. – 568 с.
3. Калинкина Н.В. Повреждения сердца антрациклинами: частота и факторы риска / Н.В. Калинкина // Український медичний часопис. – 2000. – Т. 16. – №2. – С. 25–29.
4. Коржевский Д.Э. Основы гистологической техники / Д.Э. Коржевский, А.В. Гиляров – СПб.: СпецЛит, 2010. – 95 с.
5. Индуцированная антрациклинами кардиотоксичность: механизмы развития и клинические проявления / М.Г. Матяш, Т.Л. Кравчук, В.В. Высоцкая и др. // Сибирский онкологический журнал. – 2008. – Т. 30. – №6. – С. 66–75.
6. Лапач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич. – К.: Морион, 2001. – 408 с.
7. Родинський О.Г. Поведінкові розлади у щурів на фоні експериментальної хронічної міокардіальної дисфункції / О.Г. Родинський, Ю.В. Козлова // Медичні перспективи. – 2014. – Т. 19. – №3. – С. 10–14.
8. Семенова А.И. Кардио- и нейротоксичность противоопухолевых препаратов (патогенез, клиника, профилактика, лечение) / А.И. Семенова // Практическая онкология. – 2009. – Т. 10. – №3. – С. 168–176.
9. An integrated characterization of serological, pathological, and functional events in doxorubicin-induced cardiotoxicity / L. Cove-Smith, N. Woodhouse, A. Hargreaves [et al. // Toxicol Sci. – 2014. – Vol. 140. – №1. – P. 3–15.
10. Analysis of proteome changes in doxorubicin-treated adult rat cardiomyocyte / S.N. Kumar, E.A. Konorev, D. Aggarwal, B. Kalyanaraman // J. Proteomics. – 2011. – Vol. 74. – №5. – P. 683–697.

#### References

1. Chekman, I. S., Gorchakova, N. O., Nizhenkiv's'ka, I. V., Nagorna, O. O., Mincer, V. O., Trofimova, T. S., & Vygiv's'ka, O. A. (2003) Vplyv rubomitsynu hidrokhlorydu na pokaznyky hemodynamiky u kroliv [Effect of rubomicin hydrochloride on hemodynamic parameters in rabbits]. *Medicine*, 5–6, 88–89. [in Ukrainian].
2. Stefanov, A. V. (Ed) (2002) *Doklinicheskie issledovaniya lekarstvennykh sredstv [Preclinical studies of drugs]*. Kyiv: Avicenna. [in Ukrainian].
3. Kalinkina, N. V. (2000) Povrezhdeniya serdca antraciklinami: chastota i faktory riska [Damage to the heart anthracyclines: incidence and risk factors]. *Ukrainskyi medychnyi chasopys*, 16(2), 25–29. [in Ukrainian].
4. Korzhevskij, D. E., & Gilyarov, A. V. (2010) *Osnovy gistologicheskoy tekhniki [Fundamentals of histological techniques]*. Saint Petersburg: SpecLit. [in Russian].
5. Matyash, M. G., Kravchuk, T. L., Vysotskaya, V. V., Chernov, V. I., Goldberg, V. E. (2008) Inducirovannaya antraciklinami kardiotoksichnost': mekhanizmy razvitiya i klinicheskie proyavleniya [Anthracycline-induced cardiotoxicity: mechanisms of development and clinical manifestations]. *Sibirskij onkologicheskij zhurnal*, 30(6), 66–75. [in Russian].
6. Lapach, S. N., Chubenko, A. V., Babich, P. N. (2001) *Statisticheskie metody v mediko-biologicheskikh issledovaniyakh s ispol'zovaniem Excel [Statistical methods in biomedical research using Excel]*. Kyiv: Morion. [in Ukrainian].
7. Rodynskiy, O. G., & Kozlova, Yu. V. (2014) Povedinkovi rozlady u shchuriv na foni eksperimentalnoi khronichnoi miokardialnoi dysfunktsii [Behavioral disorders in rats on a background of chronic experimental myocardial dysfunction]. *Medychni perspektyvy*, 19(3), 10–14. [in Ukrainian].
8. Semenova, A. I. (2009) Kardio- i nejrotoksichnost' protivooopukhoveykh preparatov (patogenez, klinika, profilaktika,

- lechenie) [Cardio- and neurotoxicity of anticancer drugs (pathogenesis, clinical, prevention, treatment)]. *Prakticheskaya onkologiya*, 10(3), 168–176. [in Russian].
9. Cove-Smith, L., Woodhouse, N., Hargreaves, A., Kirk, J., Smith, S., Price, S. A., et al. (2014) An integrated characterization of serological, pathological, and functional events in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicol Sci.*, 140(1), 3–15. doi: 10.1093/toxsci/kfu057.
10. Kumar, S. N., Konorev, E. A., Aggarwal, D. & Kalyanaraman, B. (2011) Analysis of proteome changes in doxorubicin-treated adult rat cardiomyocyte. *J. Proteomics*, 74 (5), 683–697. doi: 10.1016/j.jprot.2011.02.013.
- 

**Відомості про авторів:**

Родинський О.Г., д. мед. н., професор, зав. каф. фізіології, ДЗ «Дніпропетровська державна медична академія МОЗ України».  
Козлова Ю.В., аспірант каф. фізіології, ДЗ «Дніпропетровська державна медична академія МОЗ України», E-mail: jylyftuna@ukr.net.  
Гузь Л.В., к. біол. н., викладач каф. фізіології, ДЗ «Дніпропетровська державна медична академія МОЗ України».

**Сведения об авторах:**

Родинский А.Г., д. мед. н., профессор, зав. каф. физиологии, ГУ «Днепропетровская государственная медицинская академия МЗ Украины».  
Козлова Ю.В., аспирант каф. физиологии, ГУ «Днепропетровская государственная медицинская академия МЗ Украины»,  
E-mail: jylyftuna@ukr.net.

Гузь Л.В., к. биол. н., преподаватель каф. физиологии, ГУ «Днепропетровская государственная медицинская академия МЗ Украины».

**Information about authors:**

Rodinskij A.G., Professor, DM, Head of the Department of Physiology SE «Dnipropetrovsk Medical Academy of Health Ministry of Ukraine».

Kozlova Ju. V., Aspirant of the Department of Physiology, SE «Dnipropetrovsk Medical Academy of Health Ministry of Ukraine»,

E-mail: jylyftuna@ukr.net.

Guz' L.V., PhD, Instructor of the Department of Physiology, SE «Dnipropetrovsk Medical Academy of Health Ministry of Ukraine».

---

Надійшла в редакцію 17.03.2015 р.

УДК 616.1-091.8-053.1-02:618.3-06

А. Ф. Яковцова<sup>1</sup>, В. Д. Марковський<sup>1</sup>, І. В. Сорокіна<sup>1</sup>, І. В. Борзенкова<sup>2</sup>, О. М. Плітень<sup>1</sup>,  
М. С. Мирошніченко<sup>1</sup>, О. В. Калужина<sup>1</sup>

## Морфофункціональні особливості серцево-судинної системи плодів і новонароджених від матерів з ускладненою вагітністю: основні здобутки харківської школи патологоанатомів

<sup>1</sup>Харківський національний медичний університет,

<sup>2</sup>КЗОЗ «Обласна клінічна лікарня – Центр екстреної медичної допомоги та медицини катастроф», м. Харків

**Ключові слова:** ускладнення вагітності, новонародженого хвороби, плода хвороби.

Патологія серцево-судинної системи у дітей є актуальною проблемою сьогодення. З метою виявлення морфофункціональних особливостей серця, легеневої артерії та аорти плодів і новонароджених від матерів, вагітність яких ускладнилась артеріальною гіпертензією, затримкою внутрішньоутробного розвитку та преєклампсією, здійснили гістологічні, гістохімічні, імуногістохімічні, морфометричні дослідження. Виявили, що у серцево-судинній системі плода та новонародженого від матерів з ускладненою вагітністю виникають різні за характером і ступенем вираженості структурні зміни, які створюють передумови для формування патологічних станів серцево-судинної системи на наступних етапах онтогенезу та потребують профілактичних заходів.

### Морфофункциональные особенности сердечно-сосудистой системы плодов и новорожденных от матерей с осложненной беременностью: основные достижения харьковской школы патологоанатомов

А. Ф. Яковцова, В. Д. Марковский, И. В. Сорокина, И. В. Борзенкова, О. Н. Плитень, М. С. Мирошниченко, О. В. Калужина

Патология сердечно-сосудистой системы у детей является актуальной проблемой современности. С целью установления морфофункциональных особенностей сердца, легочной артерии и аорты плодов и новорожденных от матерей, беременность которых осложнена артериальной гипертензией, задержкой внутриутробного развития и преэклампсией, провели гистологические, гистохимические, иммуногистохимические, морфометрические исследования. Установлено, что в сердечно-сосудистой системе плода и новорожденного от матерей с осложненной беременностью возникают различные по характеру и степени выраженности структурные изменения, которые создают предпосылки для формирования патологических состояний сердечно-сосудистой системы на последующих этапах онтогенеза и требуют профилактических мероприятий.

**Ключевые слова:** осложнения беременности, новорожденного болезни, плода болезни.

**Патология.** – 2015. – №1 (33). – С. 12–16

### Morphological and functional characteristics of the cardiovascular system of fetuses and newborns from mothers with complicated pregnancy: the main achievements of the pathologists of Kharkiv school

A. F. Yakovtsova, V. D. Markovsky, I. V. Sorokina, I. V. Borzenkova, O. N. Pliten, M. S. Myroshnychenko, O. V. Kaluzhina

Cardiovascular system pathology in children is an important problem of our time.

**Aim.** The purpose of this article was to present the main results of investigations of the pathologists of Kharkiv school for studying morphological and functional features of the heart, pulmonary artery and aorta of fetuses and newborns from mothers with complicated pregnancy by arterial hypertension, intrauterine growth retardation and preeclampsia.

**Methods and results.** The morphological and functional characteristics of the heart of fetus and newborn with intrauterine growth retardation, heart and aorta of fetus and newborn from mother with complicated pregnancy by arterial hypertension, aorta and pulmonary artery of fetus and newborn from mothers with complicated pregnancy by preeclampsia were studied by authors using histological, histochemical, immunohistochemical, morphometrical and statistical methods. It was established that in the cardiovascular system of the fetus and newborn from mothers with complicated pregnancy there are structural changes of various nature and degree of manifestation which create the preconditions for the formation of cardiovascular system pathology in later stages of ontogenesis and require the implementation of preventive measures.

**Key words:** Cardiovascular System, Morphology, Complications Pregnancy, Newborn Diseases, Fetal Diseases.

**Pathologia.** 2015; №1 (33): 12–16

Захворювання серцево-судинної системи (ССС) серед дітей є найбільш актуальною проблемою педіатрії у зв'язку з високим рівнем поширеності та збільшенням частоти цієї патології у структурі загальної захворюваності, високим ризиком розвитку ускладнень та інвалідизації дитячого населення [4,9]. Значний відсоток патології ССС у плодів і новонароджених зумовлений складністю розвитку цієї системи та багатьма факторами, які впливають на розвиток плода у пренатальному періоді [6]. Численні дослідження, що виконали співробітники кафедри патологічної анатомії

Харківського національного медичного університету, доводять можливість пошкодження органів ССС плодів і новонароджених під впливом екстрагенітальної та генітальної патології материнського організму, а також ускладнень, котрі виникають під час вагітності та пологів.

#### Мета роботи

Виявлення морфофункціональних особливостей серця, легеневої артерії та аорти плодів і новонароджених від матерів, вагітність яких ускладнилась артеріальною гіпертензією, затримкою внутрішньоутробного розвитку та преєклампсією.

**Матеріали і методи дослідження**

Матеріал дослідження – тканина серця, легеневої артерії (ЛА) та аорти доношених плодів і новонароджених.

Протягом вивчення морфофункціональних особливостей серця плодів та новонароджених із затримкою внутрішньоутробного розвитку (ЗВУР) матеріал поділили на 3 групи: 1 група (34 випадки) – середньовагові плоди та новонароджені з антропометричними показниками, що відповідають терміну гестації; 2 група (27 випадків) – плоди та новонароджені з симетричним варіантом ЗВУР (сЗВУР); 3 група (23 випадки) – плоди та новонароджені з асиметричним варіантом ЗВУР (асЗВУР).

Під час вивчення морфофункціональних особливостей серця й аорти плодів і новонароджених від матерів з артеріальною гіпертензією (АГ), яка пов'язана з наявністю гіпертонічної хвороби у жінки або була проявом гестозу, матеріал поділили на 2 групи: 1 група – 50 сердець та аорт плодів і новонароджених від матерів із неускладненою вагітністю; 2 група – 150 сердець і 30 аорт плодів і новонароджених від матерів з АГ.

Вивчаючи морфофункціональні особливості аорти та ЛА плодів і новонароджених від матерів із вагітністю, що ускладнена прееклампсією (ПЕ), матеріал поділили на 2 групи: 1 (контрольна, 13 випадків) – плоди та новонароджені від матерів із неускладненою вагітністю; 2 (досліджувана, 29 спостережень) – плоди та новонароджені, матері яких страждали на ПЕ різних ступенів тяжкості: I – легкий (n=12), II – середній (n=12), III – тяжкий (n=5).

Під час досліджень використали гістологічні (забарвлення гематоксилином та еозином, пікрофуксином за ван Гізоном), гістохімічні (забарвлення за методом Рего, Лі, Маллорі, PAS-реакція), імуногістохімічні (моноклональні антитіла до каспази-3, ендотеліальної (eNOs) та індукцйбельної (iNOs) фракції синтази окису азоту, колагенів I, III і IV типів, CD34, гладком'язового актину), морфометричні методи дослідження. Гістологічні препарати вивчали на мікроскопах Olympus BX-41 (Японія) та «Axioskop 40» (Carl Zeiss, ФРН).

Цифровий масив даних опрацювали за допомогою методів математичної статистики з використанням варіаційного, альтернативного й кореляційного аналізів. Математичний аналіз виконали на персональному комп'ютері з використанням пакета прикладних програм фірми Microsoft «Excel-5.0».

**Результати та їх обговорення**

ЗВУР плода чи новонародженого є найбільш характерним проявом хронічної внутрішньоутробної гіпоксії, що зумовлена материнськими, плацентарними та плодовими факторами [8]. Протягом досліджень встановили, що у плодів і новонароджених зі сЗВУР (особливо з асЗВУР) показники маси серця, товщини стінки лівого шлуночка (ЛШ) і правого шлуночка (ПШ) серця вірогідно знижені, порівнюючи з середньоваговими дітьми. Зниження маси серця та товщини стінок шлуночків серця більшість дослідників пов'язують із низьким рівнем тканинних факторів росту в дітей зі ЗВУР [2]. Характеризуючи товщину стінок шлуночків серця, виявили вірогідне переважання

товщини стінки ПШ над товщиною стінки ЛШ у плодів, а також товщини стінки ЛШ над товщиною стінки ПШ у новонароджених. Це можна пояснити неоднаковою функціональною активністю різних частин серця на етапах онтогенезу.

Протягом мікроскопічного дослідження сердець дітей зі ЗВУР виявили морфологічні зміни, більш виражені у стінці ПШ у плодів і ЛШ у новонароджених. Очевидно, це пов'язано з їхнім більшим функціональним навантаженням на етапах онтогенезу. Максимально виражені морфофункціональні зміни в серці відзначили у плодів і новонароджених з асЗВУР у порівнянні з сЗВУР. Під час мікроскопічного дослідження поряд із нормальними м'язовими волокнами виявили ділянки з нерівномірною гіпертрофією й атрофією окремих волокон серцевого м'яза, нерівномірно виражену поперечну посмугованість, великі ділянки хвилеподібної деформації м'язових волокон, контрактурні зміни кардіоміоцитів, фрагментацію м'язових волокон з ознаками некрозу, внутрішньоклітинний міоцитоліз, глибчастий розпад міофібрил, ознаки жирової дистрофії. Крім того, в дітей зі ЗВУР у серці визначили ішемічно змінені ділянки міокарда, максимально виражені при асЗВУР.

У кардіоміоцитах ядра, переважно округло-овальної форми, у клітинах мали центральне розташування. У більшості випадків ядерний хроматин розташовувався по периферії ядра. У дітей зі ЗВУР встановили вірогідне зниження площі та периметра ядра кардіоміоцита у шлуночках серця у порівнянні із середньоваговими дітьми.

У серці дітей зі ЗВУР виявили дисциркуляторні зміни, що характеризувалися парезом судин, формуванням крововиливів, ознаками стромального та периваскулярного набряків, наявністю в судинах дрібних тромбів на різних стадіях організації.

У дітей зі ЗВУР у серцях виявили ознаки ендотеліальної дисфункції, максимально виражені при асЗВУР, що характеризувалися пригніченням eNOs та активацією iNOs. Крім того, в серцях у дітей зі сЗВУР (особливо з асЗВУР) встановили збільшення кількості клітин у стані апоптозу, що є наслідком не тільки перебудови серця, але і його ушкодження.

Морфометричне дослідження показало, що серце плодів і новонароджених зі сЗВУР та асЗВУР характеризувалось диспропорціональністю структурної будови, що проявлялося збільшенням питомого об'єму сполучної тканини, ендомізю та зниженням питомого об'єму кардіоміоцитів, судин і, як наслідок, зниження трофічного індексу в порівнянні з середньоваговими дітьми. Неадекватна васкуляризація міокарда супроводжувалася прогресуванням кардіосклерозу та розвитком дистрофічних змін [6].

Морфофункціональні зміни у серці в дітей зі ЗВУР можуть бути підґрунтям для розвитку кардіоваскулярної патології у житті. Накопичено достатньо катамнестичних даних про те, що в людей із пренатальною ЗВУР в анамнезі у зрілому віці можливий розвиток різних захворювань, адже виявлений тісний зв'язок між синдромом ЗВУР та АГ, ішемічною хворобою серця [7].

АГ є частою патологією ССС, що ускладнює перебіг вагітності, пологів і післяпологового періоду [1]. У результаті досліджень встановили, що тривала АГ у системі «мати – плацента – плід» супроводжується розвитком гіпертрофічних і гіперпластичних процесів на всіх рівнях організації серцевого м'язу. При АГ у вагітних у серці плодів і новонароджених виявили внутрішньоклітинний міоцитоліз і контрактурні зміни. Визначили переважну схильність до пошкодження за контрактурним типом у м'язових клітинах, що знаходяться поблизу дрібних вен. Фокуси міоцитолізу розташовувалися дифузно, без зв'язку з судинами; найчастіша локалізація – субендокардіальні відділи. У серці у плодів і новонароджених від матерів з АГ виявили виражені склеротичні зміни, що призводили до зниження питомого об'єму м'язових волокон. Зміни скоротливого міокарда у плодів і новонароджених від матерів з АГ поєднувалися із дистрофічними і склеротичними змінами у провідній системі серця, що може призвести до розвитку різних порушень ритму та провідності.

В аорті плодів і новонароджених від матерів з АГ також виявили структурні зміни, що проявлялись у порушенні інтеграції ендотелію, розширенні міжендотеліальних щілин із появою великої кількості кратерів, стомат і стигмат, полів аргірофільних ендотеліальних клітин. Структурні зміни в аорті в поєднанні зі змінами спектра ліпідного обміну можуть бути передумовою для розвитку атеросклеротичних процесів [3].

Незважаючи на досягнення сучасної медицини, ПЕ є однією з провідних причин материнської та перинатальної смертності. Питома вага ПЕ у структурі ускладнень вагітності коливається від 10,1 до 20,0%, а серед причин материнської та перинатальної смертності становить 21,3% і 12,1% відповідно [4,10].

Протягом макроскопічного дослідження встановили, що стінка ЛА та аорти в контрольній групі була еластичною, гладкою, з блискучою інтимою. Під час мікроскопічного дослідження судин цієї групи визначили 3 оболонки: внутрішню, середню та зовнішню. Внутрішня оболонка обох судин була дуже тонкою, складалася з ендотелію та підендотеліального шару, сплетіння еластичних волокон, без чітких контурів переходила в медіальну оболонку. Враховуючи це, визначили відносний об'єм tunica intima та tunica media разом (62,00±8,09% для ЛА, 70,00±7,64% для аорти).

Ендотелій являв собою розташовані на базальній мембрані переважно одноядерні клітини різної величини та форми (заввишки в ЛА  $12,67 \pm 0,82 \times 10^{-6}$  м, в аорті –  $15,78 \pm 0,44 \times 10^{-6}$  м, завширшки в ЛА  $5,69 \pm 0,21 \times 10^{-6}$  м, в аорті –  $5,72 \pm 0,21 \times 10^{-6}$  м), які щільно прилягали одна до одної. Інтенсивно забарвлене гематоксиліном та еозином овальне ядро розташовувалося центрально. Цитоплазма була однорідною та помірно еозинофільною. В одичних полях зору в судинах визначили десквамовані ендотеліоцити ( $1,31 \pm 0,12$  клітини в ЛА,  $0,69 \pm 0,09$  клітини в аорті). Оптичну щільність інтенсивності світіння клітин ендотелію показував маркер CD34, який становив  $0,62 \pm 0,03$  ум. од. св. для ЛА та  $0,615 \pm 0,030$  ум. од. св. для аорти. Тонка базальна мембрана, що відокремлювала

ендотеліальні клітини від сполучної тканини, рівномірно забарвлювалась еозином, накопичувала колаген IV типу, який спостерігали у вигляді імунофлуоресценції помірної інтенсивності (для ЛА –  $0,56 \pm 0,02$  ум. од. св., для аорти –  $0,556 \pm 0,020$  ум. од. св.).

Підендотеліальний шар утворювали пухка тонкофібрилярна сполучна тканина, велика кількість клітин зірчастої форми, поодинокі гладкі міоцити. Гладкі міоцити рівномірно розташовувалися по всій товщі стінки обох судин, їхня щільність у полі зору для ЛА становила  $27,03 \pm 0,49$ , для аорти –  $28,76 \pm 0,68$ . Глибше підендотеліального шару при забарвленні за Маллорі визначили густе сплетіння еластичних волокон у складі внутрішньої оболонки, котре відповідало внутрішній еластичній мембрані. Сполучна тканина підендотеліального шару рівномірно накопичувала переважно колаген III типу (в ЛА –  $0,385 \pm 0,020$  ум. од. св., в аорті –  $0,383 \pm 0,020$  ум. од. св.), а колаген I типу виявили у вигляді дуже слабкого світіння (в ЛА –  $0,291 \pm 0,020$  ум. од. св., в аорті –  $0,289 \pm 0,020$  ум. од. св.). Відносний об'єм еластичних і колагенових волокон у ЛА становив  $48,00 \pm 9,12$  % та  $52,00 \pm 9,12$  % відповідно, в аорті –  $50,90 \pm 9,13$  % та  $49,10 \pm 9,13$  % відповідно. Зовнішня оболонка в ЛА становила  $38,00 \pm 8,09$  %, а в аорті –  $30,00 \pm 7,64$  % відносного об'єму щодо загальної товщі. У ній визначили колагенові та еластичні волокна, дрібні помірно повнокровні кровеносні та лімфатичні судини, нервові волокна без ознак дистрофічних змін. В адвентиції при забарвленні стінки судин пікрофуксином за ван Гізеном спостерігали помірну фуксинофілію.

Макроскопічна картина обох судин у контрольній і групах дослідження суттєво не відрізнялась, а мікроскопічна була відмінною для кожної групи з ПЕ. Так, відносні об'єми суми внутрішньої та середньої оболонок ЛА прогресивно наростали з поглибленням тяжкості ПЕ (ПЕ I –  $64,0 \pm 8,0$  %, ПЕ II –  $66,00 \pm 7,89$  %, ПЕ III –  $68,00 \pm 7,77$  %), а в аорті зменшувались (ПЕ I –  $69,50 \pm 7,67$  %, ПЕ II –  $62,40 \pm 8,07$  %, ПЕ III –  $60,00 \pm 8,16$  %).

Аналізуючи показники відносного об'єму зовнішньої оболонки щодо кожної судини, виявили зворотну тенденцію. Так, їхні показники в ЛА зменшувалися від групи до групи (ПЕ I –  $36,0 \pm 8,0$  %, ПЕ II –  $34,00 \pm 7,89$  %, ПЕ III –  $32,00 \pm 7,77$  %), а в аорті збільшувались у такому ж напрямку (ПЕ I –  $32,00 \pm 7,77$  %, ПЕ II –  $38,00 \pm 8,09$  %, ПЕ III –  $40,00 \pm 8,16$  %). Ендотеліоцити витягнуто-овальної форми обох судин прилягали один до одного, подекуди розташовувались палісадоподібно щодо стінки судини. З поглибленням тяжкості ПЕ відзначали сплющення ендотеліоцитів, а також збільшення полів десквамації в одному полі зору як у ЛА (ПЕ I –  $1,31 \pm 0,12$ , ПЕ II –  $4,34 \pm 0,09$ , ПЕ III –  $6,34 \pm 0,09$ ), так і в аорті (ПЕ I –  $0,69 \pm 0,09$ , ПЕ II –  $3,34 \pm 0,09$ , ПЕ III –  $5,69 \pm 0,09$ ).

Дослідження оптичної щільності інтенсивності світіння ендотелію CD34 виявило зменшення цього показника від групи до групи в ЛА (в ПЕ I –  $0,58 \pm 0,01$  ум. од. св., в ПЕ II –  $0,508 \pm 0,020$  ум. од. св., у ПЕ III –  $0,401 \pm 0,010$  ум. од. св.) та аорті (в ПЕ I –  $0,572 \pm 0,010$  ум. од. св., у ПЕ II –  $0,501 \pm 0,020$  ум. од. св.,

у ПЕ III –  $0,398 \pm 0,030$  ум. од. св.), що може вказувати на зниження адгезивних властивостей ендотеліоцитів. Базальна мембрана була потовщеною, вміст колагену IV типу в ній у групах, що досліджували, порівнюючи з контролем, знижувався від ПЕ I до ПЕ III як у ЛА (ПЕ I –  $0,52 \pm 0,03$  ум. од. св., ПЕ II –  $0,442 \pm 0,040$  ум. од. св., ПЕ III –  $0,321 \pm 0,050$  ум. од. св.), так і в аорті (ПЕ I –  $0,516 \pm 0,030$  ум. од. св., ПЕ II –  $0,438 \pm 0,040$  ум. од. св., ПЕ III –  $0,319 \pm 0,050$  ум. од. св.). В її структурі визначили колаген III типу, де, як відомо, має бути колаген IV типу – загальноновизнана складова базальних мембран судин. На наявність склеротичних змін вказувала поява нехарактерного для неї інтерстиціального колагену III типу.

Оптична щільність світіння колагену I типу в середній і зовнішній оболонках обох судин зростала від легкої до тяжкої ПЕ (в ЛА: ПЕ I –  $0,308 \pm 0,040$  ум. од. св., ПЕ II –  $0,356 \pm 0,020$  ум. од. св., ПЕ III –  $0,380 \pm 0,030$  ум. од. св.; в аорті: ПЕ I –  $0,307 \pm 0,040$  ум. од. св., ПЕ II –  $0,359 \pm 0,020$  ум. од. св., ПЕ III –  $0,375 \pm 0,030$  ум. од. св.). Аналогічно змінювався й колаген III типу (в ЛА: ПЕ I –  $0,39 \pm 0,035$  ум. од. св., ПЕ II –  $0,408 \pm 0,020$  ум. од. св., ПЕ III –  $0,452 \pm 0,030$  ум. од. св.; в аорті: ПЕ I –  $0,387 \pm 0,0350$  ум. од. св., ПЕ II –  $0,406 \pm 0,020$  ум. од. св., ПЕ III –  $0,449 \pm 0,030$  ум. од. св.).

Щільність розташування гладких міоцитів у судинах досліджуваних груп прогресивно зменшувалася відповідно до поглиблення тяжкості ПЕ. Найбільшу кількість клітин виявили у ближчій до інтими третини медіальної оболонки. Крім того, від ПЕ I до ПЕ III відносні об'єми колагенових волокон збільшувались, а еластичних волокон зменшувалися, хоча в аорті в перших двох групах були дещо вищими за контрольні значення. Колагенові та еластичні волокна з ознаками набряку, помітно повнокровні кровоносні судини, нервові волокна без дистрофічних змін утворювали адвентиціальну оболонку, в якій в обох судинах спостерігали посилення фуксинофілії з посиленням патологічних змін при забарвленні пікрофуксином за ван Гізеном [5, 10].

### Висновки

1. Для внутрішньоутробного періоду розвитку характерний найбільш інтенсивний ріст у порівнянні з іншими періодами онтогенезу. Імовірно, це має визначальне значення при поясненні високої чутливості плода до материнської патології.

2. У серці плодів і новонароджених зі ЗВУР виявили структурні зміни паренхіми та строми (нерівномірно виражена поперечна посмугованість, хвилеподібна деформація м'язових волокон, контрактурні зміни кардіоміоцитів, фрагментація м'язових волокон з ознаками некрозу, внутрішньоклітинний міоцитоліз, глибокий розпад міофібрил, жирова дистрофія, дисциркуляторні зміни, ендотеліальна дисфункція, висока активність апоптотичних процесів, склеротичні зміни), максимально виражені у плодів і новонароджених з асЗВУР (у порівнянні зі сЗВУР). У плодів названі зміни більш виражені у стінці правого шлуночка серця, а у новонароджених – у стінці лівого шлуночка.

3. При АГ у вагітних у серці плодів і новонароджених виявили структурні зміни у скоротливому міокарді (контрактурні зміни кардіоміоцитів, внутрішньоклітинний міоцитоліз, ознаки склерозу), що поєднувалися з дистрофічними та склеротичними змінами у провідній системі серця. В аорті плодів і новонароджених від матерів з АГ також визначили структурні зміни, що проявлялися в порушенні інтеграції ендотелію, розширенні міжендотеліальних щілин із появою великої кількості кратерів, стомат і стигмат, полів аргірофільних ендотеліальних клітин.

4. Прееклампсія матері призводить до морфологічних змін у ЛА та аорті плодів і новонароджених, що проявляються в посиленні десквамації ендотелію, зниженні його адгезивних властивостей, зменшенні кількості гладких міоцитів у товщі стінки, змінненні співвідношення еластичних і колагенових волокон у бік останніх і посиленні склеротичних змін.

5. Структурні зміни у ССС плода та новонародженого від матерів, вагітність яких ускладнилась АГ, ЗВУР і ПЕ, створюють передумови для формування патологічних станів ССС на етапах онтогенезу та потребують профілактичних заходів.

**Перспективою подальших досліджень** є експериментальне моделювання та вивчення впливу різних видів гіпоксії і бактеріальної материнської патології на ССС плода та новонародженого, що буде здійснюватися в рамках науково-дослідної роботи кафедри патологічної анатомії Харківського національного медичного університету за темою: «Вплив плодово-материнської інфекції на ембріогенез та фетогенез нащадків (клініко-морфологічне дослідження)».

### Список літератури

1. Гамзаева С.Э. Влияние артериальной гипертензии на механизмы формирования маточно-плацентарно-плодового кровотока / С.Э. Гамзаева // *Фундаментальные исследования*. – 2013. – №9. – Ч. 1. – С. 14–18.
2. Лутфуллин И.Я. Вклад дефицита массы тела при рождении в формировании риска последующей кардиоваскулярной патологии / И.Я. Лутфуллин, А.И. Сафина, З.Р. Садыкова // *Вестник современной клинической медицины*. – 2013. – Т. 6. – Вып. 1. – С. 53–58.
3. Марковский В.Д. Морфофункциональные особенности сердца плодов и новорожденных и послета при артериальной гипертензии у беременных : автореф. дис. на соискание учен. степени д.мед.н. : спец. 14.00.15 «Патологическая анатомия» / В.Д. Марковский. – Харьков, 1992. – 32 с.
4. Марковский В.Д. Патологическая анатомия сердца при задержке внутриутробного развития / В.Д. Марковский, В.В. Гаргин, М.С. Мирошниченко. – Харьков : Финарт, 2010. – 158 с.
5. Марковский В.Д. Морфологичні особливості легеневої артерії у плодів та новонароджених від матерів з преєклампсією / В.Д. Марковский, І.В. Сорокіна, О.В. Калужина // *Клінічна та експериментальна медицина*. – 2014. – №3(64). – С. 86–90.
6. Мирошниченко М.С. Патологічна анатомія серця при затримці внутрішньоутробного розвитку : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня к.мед.н. : спец. 14.03.02 «Патологічна анатомія» / М.С. Мирошниченко. – Х., 2011. – 19 с.

7. Нагаева Е.В. «Внутриутробное программирование» гормонально-метаболических процессов и синдром задержки внутриутробного развития / Е.В. Нагаева, Т.Ю. Ширяева // Проблемы эндокринологии. – 2010. – №6. – С. 32–40.
  8. Оценка состояния плода при его задержке внутриутробного развития / Т.И. Слюсарь, О.Г. Белоусов, О.А. Джеломанова и др. // Таврический медико-биологический вестник. – 2011. – Т. 14. – №3. – С. 2(55). – С. 185–187.
  9. Резніченко Ю.Г. Вплив патології антенатального періоду на морфогенез та функціонування серцево-судинної системи / Ю.Г. Резніченко, О.М. Лебединець, М.Л. Волошин // Перинатологія і педіатрія. – 2013. – №1. – С. 82–86.
  10. Сравнительная характеристика морфологических изменений эндотелия легочной артерии и аорты у плодов и новорожденных от матерей с преэклампсией / В.Д. Марковский, И.В. Сорокина, О.В. Калужина и др. // Universum: Медицина и фармакология. – 2014. – №8(9) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: URL: <http://7universum.com/en/med/archive/item/1523>.
- References**
1. Gamzaeva, S. E. (2013) Vliyanie arterial'noj gipertenzii na mekhanizmy formirovaniya matochno-placentarno-plodovogo krovotoka [Influence of arterial hypertension on the mechanisms of utero-placental-fetal blood flow formation]. *Fundamental'nye issledovaniya*, 9(1), 14–18. [in Russian].
  2. Lutfullin, I. Ya., Safina, A. I., & Sadykova, Z. R. (2013) Vklad defitsita massy tela pri rozhdenii v formirovanii riska posleduyushchej kardiovaskulyarnoj patologii [The impact of low birth weight to the subsequent risk of cardiovascular diseases]. *Vestnik sovremennoj klinicheskoy mediciny*, 6(1), 53–58. [in Russian].
  3. Markovskij, V. D. (1992) *Morfofunktional'nye osobennosti serdca plodov i novorozhdennykh i posleda pri arterial'noj gipertonii u beremennykh* (Avtoref. dis... dokt. med. nauk) [Morphological and functional characteristics of the fetal and newborn heart and placenta in pregnant women with arterial hypertension. Dr. med. sci. diss.]. Khar'kov. [in Ukrainian].
  4. Markovskij, V. D., Gargin, V. V., & Miroshnichenko, M. S. (2010) *Patologicheskaya anatomiya serdtsa pri zaderzhke vnutriutrobnogo razvitiya* [Pathological anatomy of the heart during intrauterine growth restriction]. Khar'kov: Finart [in Ukrainian].
  5. Markovskiy, V. D., Sorokina, I. V., & Kaluzhyna, O. V. (2014) Morfolohichni osoblyvosti lehevevoi arterii u plodiv ta novonarozhdennykh vid materiv z preeklampsiiu [The morphological features of the pulmonary arteries in fetuses and newborns from mothers with preeclampsia]. *Klinichna ta eksperymentalna medytsyna*, 3(64), 86–90. [in Ukrainian].
  6. Myroshnychenko, M. S. (2011) *Patolohichna anatomiya sertsia pry zatrymsi vnutrishnoutrobnoho rozvytku* (Avtoref. dis...kand. med. nauk). [Pathological anatomy of the heart during intrauterine growth restriction]. (Extended abstract of candidate's thesis). Kharkiv. [in Ukrainian].
  7. Nagaeva, E. V., & Shiryayeva, T. Yu. (2010) «Vnutriutrobnoe programmirovaniye» gormonal'no-metabolicheskikh protsessov i sindrom zaderzhki vnutriutrobnogo razvitiya [«Intrauterine programming» of hormone-metabolic processes and intrauterine growth retardation syndrome]. *Problemy e'ndokrinologii*, 6, 32–40. [in Russian].
  8. Slyusar', T. I., Belousov, O. G., Dzhelomanova, O. A., Pilipenko, O. N., & Levchenko, I. I. (2011) Ocenka sostoyaniya ploda pri ego zaderzhke vnutriutrobnogo razvitiya [Assessment of the fetus status during its intrauterine growth retardation]. *Tavrisheskij mediko-biologicheskij vestnik*, 14(3), 2(55), 185–187. [in Ukrainian].
  9. Reznichenko, Yu. H., Lebedynets, O. M., & Voloshyn, M. L. (2013) Vplyv patolohii antenatalnogo periodu na morfohenez ta funktsionuvannya sertsevo-sudynnoi systemy [The influence of the antenatal pathology period and morphogenesis and functioning of the cardiovascular system]. *Perinatolohiia i pediatriia*, 1, 82–86. [in Ukrainian].
  10. Markovskij, V. D., Sorokina, I. V., Kaluzhina, O. V., & Pliten, O. N. (2014) Sravnitel'naya kharakteristika morfolohicheskikh izmenenij e'ndoteliya legochnoj arterii i aorty u plodov i novorozhdennykh ot materey s pree'klampsiej [Comparative characteristics of morphological changes of the pulmonary artery and aorta endothelium in fetuses and newborns from mothers with preeclampsia]. *Universum: Medicina i farmakologiya*, 8 (9). Retrieved from <http://7universum.com/en/med/archive/item/1523> [in Russian].

**Відомості про авторів:**

Яковцова А.Ф., д. мед. н., професор каф. патологічної анатомії, Харківський національний медичний університет.  
Марковський В.Д., д. мед. н., професор каф. патологічної анатомії, проректор з науково-педагогічної роботи, Харківський національний медичний університет.  
Сорокіна І.В., д. мед. н., професор, в.о. зав. каф. патологічної анатомії, Харківський національний медичний університет.  
Борзенкова І.В., зав. патологоанатомічного відділення, КЗОЗ «Обласна клінічна лікарня – Центр екстреної медичної допомоги та медицини катастроф».  
Плітень О.М., к. мед. н., доцент каф. патологічної анатомії, Харківський національний медичний університет.  
Мирошніченко М.С., к. мед. н., асистент каф. патологічної анатомії, Харківський національний медичний університет, E-mail: mmmmmccc@mail.ru.  
Калужина О.В., аспірант каф. патологічної анатомії, Харківський національний медичний університет.

**Сведения об авторах:**

Яковцова А.Ф., д. мед. н., профессор каф. патологической анатомии, Харьковский национальный медицинский университет.  
Марковский В.Д., д. мед. н., профессор каф. патологической анатомии, проректор по научно-педагогической работе, Харьковский национальный медицинский университет.  
Сорокина И.В., д. мед. н., профессор, и.о. зав. каф. патологической анатомии, Харьковский национальный медицинский университет.  
Борзенкова И.В., зав. патологоанатомическим отделением, КВОЗ «Областная клиническая больница – Центр экстренной медицинской помощи и медицины катастроф».  
Плитень О.Н., к. мед. н., доцент каф. патологической анатомии, Харьковский национальный медицинский университет.  
Мирошныченко М.С., к. мед. н., ассистент каф. патологической анатомии, Харьковский национальный медицинский университет, E-mail: mmmmmccc@mail.ru.  
Калужина О.В., аспирант каф. патологической анатомии, Харьковский национальный медицинский университет.

**Information about the authors:**

Yakovtsova A. F., Doctor of Medicine, professor, professor of pathological anatomy department, Kharkiv National Medical University.  
Markovsky V. D., Doctor of Medicine, professor, professor of pathological anatomy department, vice-rector for scientific and pedagogical work, Kharkiv National Medical University.  
Sorokina I. V., Doctor of Medicine, professor, acting head of pathological anatomy department, Kharkiv National Medical University.  
Borzenkova I. V., head of pathological anatomy department, The Municipal Health Care Institution «The Regional Clinical Hospital – The Center of Emergency Medicine and Disaster Medicine».  
Pliten O. N., Candidate of Medical Sciences, assistant professor of pathological anatomy department, Kharkiv National Medical University.  
Myroshnychenko M. S., Candidate of Medical Sciences, assistant of pathological anatomy department, Kharkiv National Medical University, E-mail: mmmmmccc@mail.ru.  
Kaluzhina O. V., graduate student of pathological anatomy department, Kharkiv National Medical University.

Надійшла в редакцію 01.04.2015 р.



УДК 616.132-091.8-053.1/31-001.8-036.12-02:618.3-06

О. В. Калужина

## Морфологічний стан аорти у плодів і новонароджених, які перенесли хронічну внутрішньоутробну гіпоксію (експериментальне дослідження)

Харківський національний медичний університет

**Ключові слова:** гіпоксія, вагітність, аорта, експерименти на тваринах.

Серцево-судинна система в новонароджених уражається у 40–70% випадків при хронічній гіпоксії. З метою виявити морфологічні особливості аорти у плодів і новонароджених, які зазнали впливу цього патогенного фактора, на 34 лабораторних щурах лінії WAG здійснили експеримент із моделювання внутрішньоутробної гіпоксії з асфіксією новонародженого в пологах. Вивчили стінку аорти за допомогою сучасних морфологічних методів. Встановили, що хронічна гіпоксія призводить до погіршення трофіки ендотелію, його сплюснення, дистрофічних процесів із наступною десквамацією клітин, зменшення щільності розташування гладких міоцитів, потовщення інтими-медії. Це свідчить, що в аорті відбуваються альтеративно-склеротичні зміни за умов впливу хронічної гіпоксії.

### Морфологическое состояние аорты у плодов и новорожденных, перенесших хроническую внутриутробную гипоксию (экспериментальное исследование)

О. В. Калужина

Сердечно-сосудистая система у новорожденных поражается в 40–70% случаев при хронической гипоксии. С целью установить морфологические особенности аорты у плодов и новорожденных, подвергшихся воздействию данного патогенного фактора, на 34 лабораторных крысах линии WAG поставили эксперимент по моделированию внутриутробной гипоксии с асфиксией новорожденного в родах. Стенку аорты изучили современными морфологическими методами. Установлено, что хроническая гипоксия приводит к ухудшению трофики эндотелия, его уплощению, дистрофическим процессам с последующей десквамацией клеток, уменьшению плотности расположения гладких миоцитов, утолщению интимы-медии. Это свидетельствует, что в аорте происходят альтеративно-склеротические изменения в условиях воздействия хронической гипоксии.

**Ключевые слова:** гипоксия, беременность, аорта, эксперименты на животных.*Патология.* – 2015. – №1 (33). – С. 17–19

### Morphological state of aorta in the fetuses and newborns suffered from chronic intrauterine hypoxia (experimental research)

O. V. Kaluzhina

The cardiovascular system in newborns with chronic hypoxia is affected in 40–70%.

Aim. To investigate morphological state of aorta in the fetuses and newborns suffered from chronic intrauterine hypoxia.

Methods and results. Aortic wall was investigated with modern morphological methods in 34 laboratory animals in order to identify the morphological features of the fetuses and newborns' vessel affected by this pathogenic factor. It was established that chronic hypoxia leads to endothelial trophics deterioration, its flattening, dystrophic processes with following cells desquamation, density reduction of smooth muscle cells, thickening of the intima-media.

Conclusion. It shows alterative-sclerotic changes in aorta in cases with chronic hypoxia influence.

**Key words:** Hypoxia, Pregnancy, Aorta, Rats.*Pathologia.* 2015; №1 (33): 17–19

Хронічна внутрішньоутробна гіпоксія (ХВГ) є причиною порушення функцій організму, змін обмінних процесів, крім того, впливає на перебіг вагітності та має різноманітні наслідки для плода, який розвивається [1]. Відомо, що 40–70% новонароджених, які страждали на перинатальну гіпоксію, мають ураження серцево-судинної системи [2]. У результаті експериментальних досліджень іноземні автори встановили, що ХВГ може викликати потовщення стінки аорти й окислювальний стрес у серці та судинах [3,4]. Деякі дослідження мають клінічну спрямованість. Однак питання впливу цього патогенного фактора на морфологічну будову аорти в нащадків остаточно не вирішені, а результати досліджень суперечливі.

Наше дослідження є частиною науково-дослідної роботи кафедри патологічної анатомії Харківського на-

ціонального медичного університету «Патоморфологічні особливості формування плода та новонародженого під впливом патології матері» (номер державної реєстрації 0110U001805).

#### Мета роботи

Виявити морфологічні особливості аорти у плодів і новонароджених, які зазнали впливу хронічної внутрішньоутробної гіпоксії.

#### Матеріали і методи дослідження

Матеріал для дослідження – тканина аорти плодів і новонароджених. На лабораторних щурах лінії WAG поставили експеримент із моделювання внутрішньоутробної гіпоксії з асфіксією новонародженого в пологах. Для цього вагітних самок щурів піддавали висотному гіпоксичному впливу, що відповідав 7500 м, від моменту реєстрації вагітності та до розродження про-

тягом 20 хвилин щодня в один і той самий час. Тварин поділили на дві групи: 1 група (контрольна) – плоди і новонароджені від матерів, яких не піддавали висотній гіпоксії (18 випадків); 2 група (досліджувана) – плоди та новонароджені від матерів, які зазнали висотного гіпоксичного впливу (16 випадків).

Після евтаназії потомства і самиць виконували розтини тварин, тканину аорти забирали для морфологічного дослідження, яке передбачало використання гістологічних, гістохімічних, імуногістохімічних і морфометричних методів. Після фіксації в 10% розчині формаліну, спиртовій проводці та парафіновій заливці виготовляли зрізи завтовшки 5–6 мкм, фарбували гематоксиліном та еозином, пікрофуксином за ван Гізеном, за Маллорі. Імуногістохімічне дослідження виконували прямим методом Кунса за методикою Brosman. Гладкі міоцити типували моноклональними антитілами до Anti-Human Smooth Muscle Actin (DAKO, Данія). Морфометричне дослідження здійснювали на мікроскопі Olympus BX-41 із використанням програм Olympus DP-Soft (Version 3:1) і Microsoft Excel 2010.

На персональному комп'ютері за допомогою ліцензійного пакета прикладних програм «Statistica 6.0» («StatSoft, Inc») статистично опрацьовували дані. Застосовували методи варіаційної та альтернативної статистики, оцінювали вірогідність за t-критерієм Стьюдента. Усі маніпуляції із щурами виконали згідно з нормативними документами щодо поводження з лабораторними тваринами.

#### Результати та їх обговорення

Макроскопічне дослідження за допомогою лупи ( $\times 3$ , 8 діоптрій) не виявило суттєвої різниці в судинах між двома групами. Аорта була еластичною, а її інтима – гладкою та блискучою. Результати мікроскопічного дослідження різнились у контрольній і досліджуваній групах.

Стінка судини в першій групі складалась із внутрішньої, середньої та зовнішньої оболонки. Ендотелій, базальна мембрана, сплетіння еластичних волокон утворювали інтиму, що без чітких меж переходила в медію. Визначили відносні обсяги tunica intima та tunica media разом ( $70,09 \pm 10,79\%$ ) і tunica adventitia окремо ( $29,91 \pm 10,79\%$ ). Ендотеліальний покрив представлений розташованими на тонкій еозинофільній базальній мембрані одноядерними клітинами середньої висоти  $3,44 \pm 0,06$  мкм і ширини  $7,25 \pm 0,18$  мкм. Середня площа ядер ендотеліоцитів дорівнювала  $6,31 \pm 0,06$  мкм<sup>2</sup>, середня площа цитоплазми –  $12,77 \pm 0,21$  мкм<sup>2</sup>, ядерно-цитоплазматичне співвідношення –  $0,59 \pm 0,02$ . В одному полі зору ( $\times 1000$ ) площа полів десквамації становила  $2,15 \pm 0,15$  клітини. Тонкофібрилярна сполучна тканина, клітини зірчастої форми, гладкі міоцити утворювали підендотеліальний шар. У товщі стінки аорти рівномірно розташовувалися гладкі міоцити зі щільністю  $24,62 \pm 0,76$  клітини у полі зору ( $\times 1000$ ). Tunica media формували еластичні та колагенові волокна, гладком'язові клітини. Відносний обсяг еластичних і колагенових волокон становив  $57,74 \pm 11,64\%$  та  $42,26 \pm 11,64\%$  відповідно. До

складу адвентиції входили колагенові й еластичні волокна, помірно повнокровні кровоносними судинами (vasa vasorum), нервові волокна без ознак дистрофічних змін і лімфатичні судини. При фарбуванні аорти пікрофуксином за ван Гізеном спостерігали помірну фуксинофілію в цій оболонці. Така будова судини тварини відповідала загальноновизнаним уявленням про фізіологічну норму [5].

Мікроскопічне дослідження аорти у групі з гіпоксією також виявило внутрішню, середню та зовнішню оболонки у складі судини. Показники відносних обсягів tunica intima і tunica media разом ( $68,72 \pm 11,59\%$ ) зменшувались, порівнюючи з контрольними, а обсяг tunica adventitia ( $31,28 \pm 11,59\%$ ) збільшувався, що пов'язано з її набряком. Одноядерні ендотеліоцити розташовувалися на базальній мембрані. Середня висота клітин дорівнювала  $3,06 \pm 0,06$  мкм, ширина –  $5,95 \pm 0,10$  мкм, що було вірогідно нижче в порівнянні з контрольними показниками ( $p < 0,001$ ) і вказувало на сплюснення ендотеліального покриву в тварин другої групи. Середня площа ядер ендотеліоцитів мала тенденцію до збільшення ( $6,58 \pm 0,15$  мкм<sup>2</sup>,  $p \geq 0,05$ ), а середня площа цитоплазми ( $9,82 \pm 0,16$  мкм<sup>2</sup>,  $p < 0,001$ ) та ядерно-цитоплазматичне співвідношення (ЯЦС,  $0,47 \pm 0,02$ ,  $p < 0,001$ ) вірогідно зменшувалися щодо значень першої групи.

Децю потовщена еозинофільна базальна мембрана може бути причиною порушення метаболічних процесів в ендотелії [6], про це свідчить збільшення площі ядер клітин із наявністю оптичних порожнин і пікнотичного зморщення та підтверджується зморщенням цитоплазми, що надалі призводить до десквамації загиблих клітин.

Десквамація ендотеліоцитів зростала у другій групі та становила  $4,60 \pm 0,16$  клітини у полі зору ( $\times 1000$ ), що є вірогідним у порівнянні з першою групою ( $p < 0,001$ ). Тонкофібрилярна сполучна тканина, клітини зірчастої форми, гладкі міоцити входили до складу підендотеліального шару.

У стінці аорти цієї групи гладком'язові клітини розташовувалися переважно рівномірно зі щільністю  $18,67 \pm 0,56$  клітини в полі зору ( $\times 1000$ ), що було вірогідно менше показників першої групи ( $p < 0,001$ ). Медіальну оболонку утворювали еластичні та колагенові волокна, гладком'язові клітини, їхній відносний обсяг становив  $61,69 \pm 12,15\%$  та  $38,31 \pm 12,15\%$  відповідно. Домінування еластичних волокон у стінці аорти шурят, незважаючи на відомий факт, що гіпоксія стимулює колагеноутворення в організмі людини [7], імовірно, можна пояснити збільшенням продукції фібронектину, ламініну, еластину ендотеліальними клітинами за умов хронічної гіпоксії [8] та активацією білків фібулінів, фібринів та емілінів, відповідальних за формування еластичних волокон [9].

Зовнішня оболонка була помірно набрякла, до її складу входили колагенові й еластичні волокна, подекуди повнокровні кровоносні (vasa vasorum) судини, нервові волокна без ознак дистрофічних змін, лімфатичні судини. В адвентиції виявили склеротичні зміни, на що вказувало посилення фуксинофілії при фарбуванні аорти пікрофуксином за ван Гізеном [10].

## Висновки

Плоди та новонароджені, які страждали на хронічну внутрішньоутробну гіпоксію, мають морфологічні зміни в аорті. Це виявляється в погіршенні трофіки ендотелію, як наслідок, відбувається потовщення базальної мембрани інтими, що призводить до зміни співвідношення ядра і цитоплазми клітин, сплюснення ендотеліоцитів, дистрофічних процесів із наступною їх десквамацією.

За умов впливу хронічної гіпоксії щільність розташування гладких м'язів різко зменшується, що може призвести до зниження скорочувальної здатності стінки судини.

Хронічна внутрішньоутробна гіпоксія стимулює збільшення еластичних волокон, тим самим змінюючи співвідношення їх із колагеновими волокнами. Цей факт можна розцінити як наслідок збільшення продукції ендотеліальними клітинами фібронектину, ламініну, еластину чи активації білків, що відповідають за формування волокон першого виду в таких умовах.

**Перспективи подальших досліджень** полягають у здійсненні імуногістохімічного дослідження адгезивних властивостей ендотеліальних клітин, колагенів у стінці аорти.

## Список літератури

1. Изучение влияния хронической внутриутробной гипоксии на течение беременности и развитие потомства в эксперименте / И.Ю. Карпова, В.В. Паршиков, А.А. Миронов и др. // Медицинский альманах. – 2011. – №6(19). – С. 55–57.
2. Шейбак Л.Н. Влияние фактора гипоксии на сердце новорожденного / Л.Н. Шейбак // Медицинские новости. – 2008. – №2. – С. 18–22.
3. Chronic intrauterine hypoxia interferes with aortic development in the late gestation ovine fetus / J.A. Thompson, B.S. Richardson, R. Gagnon, T.R. Regnault // Journal of Physiology. – 2011. – №589. – P. 3319–32.
4. Developmental programming of cardiovascular dysfunction by prenatal hypoxia and oxidative stress / D.A. Giussani, E.J. Camm, Y. Niu, et al. // PLoS ONE. – 2012. – №7(2). – e31017.
5. Гамбарян П.П. Крыса / П.П. Гамбарян, Н.М. Дукельская. – М.: Советская наука, 1955. – 254 с.
6. Liliensiek S.J. Characterization of endothelial basement membrane nanotopography in rhesus macaque as a guide for vessel tissue engineering / S.J. Liliensiek, P. Nealey, C.J. Murphy // TISSUE ENGINEERING. – 2009. – №9(15). – P. 2643–2651.
7. Falanga V. Low oxygen tension stimulates collagen synthesis and COL1A1 transcription through the action of TGF-beta1 / V. Falanga, L. Zhou, T. Yufit // Journal of Cellular Physiology. – 2002. – №191(1). – P. 42–50.
8. Замечник Т.В. Гипоксия как пусковой фактор развития эндотелиальной дисфункции и воспаления сосудистой стенки (обзор литературы) / Т.В. Замечник, Л.Н. Рогова // Вестник новых медицинских технологий. – 2012. – Т. 19. – №2. – С. 393–394.
9. Камоева С.В. Ферментные и генетические аспекты патогенеза пролапса тазовых органов и дисфункции тазового дна у женщин / С.В. Камоева // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2013. – №3. – С. 31–35.
10. Побережник Г.А. Морфологические изменения слизистой оболочки гайморовой пазухи в зависимости от причины верхнечелюстного синусита / Г.А. Побережник, О.А. Омельченко // Экологічні проблеми експериментальної та клінічної медицини. – 2013. – №1. – С. 325–338.
1. Karpova, I. Yu., Parshikov, V. V., Mironov, A. A., Kochkurova, E. V., Stulova, E. S., Novikova, Ya. S. (2011). Izuchenie vliyaniya khronicheskoy vnutriutrobnoj gipoksii na techenie beremennosti i razvitie potomstva v e'ksperimente [The study of chronic intrauterine hypoxia effect on pregnancy course and development of the offspring in the experiment]. *Medicinskij al' manakh*, 6(19), 55–57. [in Russian].
2. Shejbak, L. N. (2008). Vliyanie faktora gipoksii na serdce novorozhdennoho [Hypoxia factor influence on the newborn's heart]. *Medicinskie novosti*, 2, 18–22. [in Belarus].
3. Thompson, J. A., Richardson, B. S., Gagnon, R., Regnault, T. R. (2011). Chronic intrauterine hypoxia interferes with aortic development in the late gestation ovine fetus. *Journal of Physiology*, 589(13), 3319–32. doi:10.1113/jphysiol.2011.210625.
4. Giussani, D. A., Camm, E. J., Niu, Y., Richter, H. G., Blanco, C. E., Gottschalk, R., et al. (2012). Developmental programming of cardiovascular dysfunction by prenatal hypoxia and oxidative stress. *PLoS ONE*, 7(2), e31017. doi:10.1371/journal.pone.0031017.
5. Gambaryan, P. P., & Dukel'skaya, N. M. (1955). *Krysa [Rat]*. Moscow: Sovetskaya nauka. [in Russian].
6. Liliensiek, S. J., Nealey, P., & Murphy, C. J. (2009). Characterization of endothelial basement membrane nanotopography in rhesus macaque as a guide for vessel tissue engineering. *TISSUE ENGINEERING*, 9(15), 2643–2651. doi: 10.1089/ten.TEA.2008.0284.
7. Falanga, V., Zhou, L., T. (2002). Low oxygen tension stimulates collagen synthesis and COL1A1 transcription through the action of TGF-beta1. *Journal of Cellular Physiology*, 191(1), 42–50. doi: 10.1002/jcp.10065.
8. Zamechnik, T. V., & Rogova, L. N. (2012). Gipoksiya kak puskovoj faktor razvitiya e'ndotelial'noj disfunkcii i vospaleniya sosudistoj stenki (obzor literatury) [Hypoxia as starting factor of development of endothelial dysfunction and inflammation of the vascular wall (Literature review)]. *Vestnik novykh medicinskikh tehnologij*, 2(19), 393–394. [in Russian].
9. Kamoeva, S. V. (2013). Fermentnye i geneticheskie aspekty patogeneza prolapsa tazovykh organov i disfunkcii tazovogo dna u zhenshin [The pathogenesis of pelvic organ prolapse and pelvic floor dysfunction in women: Enzyme and genetic aspects]. *Rossiiskij vestnik akushera-ginekologa*, 3, 31–35. [in Russian].
10. Poberezhnik, H. A., & Omel'chenko, O. A. (2013). Morfoloicheskie izmeneniya slizistoj obolochki gajmarovoj pazukhi v zavisimosti ot prichiny verkhnechelyustnogo sinusita [Morphological changes in the maxillary sinus mucosa depending on the cause of the maxillary sinusitis]. *Ekologichni problemy eksperymentalnoi ta klinichnoi medycyny*, 1, 325–338. [in Ukrainian].

## Відомості про автора:

Калужина О.В., очний аспірант каф. патологічної анатомії, Харківський національний медичний університет, E-mail: kaluzhina24@ukr.net.

## Сведения об авторе:

Калужина О.В., очный аспирант каф. патологической анатомии, Харьковский национальный медицинский университет, E-mail: kaluzhina24@ukr.net.

## Information about author:

Kaluzhina O.V., Postgraduate student of Pathological Anatomy Department, Kharkiv National Medical University, E-mail: kaluzhina24@ukr.net.

Надійшла в редакцію 16.02.2015 р.

В. А. Туманский, М. Д. Зубко

## Характеристика уровня экспрессии MMP-9 и TIMP-1 в гепатоцеллюлярном и холангиоцеллюлярном раке печени

*Запорожский государственный медицинский университет***Ключевые слова:** гепатоцеллюлярная карцинома, холангиоцеллюлярная карцинома, TIMP-1, MMP-9.

С целью определения уровня иммуногистохимической экспрессии MMP-9 и ее тканевого ингибитора TIMP-1, а также площади иммунопозитивных клеток в холангиоцеллюлярном и гепатоцеллюлярном раке печени проведено патогистологическое, гистохимическое и иммуногистохимическое исследование трепанобиоптатов печени 94 больных, среди которых 55 (58,51%) пациентов страдали гепатоцеллюлярным раком печени, 39 (41,49%) – холангиоцеллюлярным раком печени. Уровень экспрессии иммуногистохимических маркеров опухолевыми клетками и площадь иммунопозитивных клеток в опухоли определяли фотоцифровой морфометрией. Установлено, что у 92,73% больных гепатоцеллюлярной карциномой и у 89,74% больных холангиоцеллюлярной карциномой в злокачественных клетках определялась цитоплазматическая экспрессия MMP-9. MMP-9-иммунопозитивные клетки составляли  $59,33 \pm 22,57\%$  площади среза ткани гепатоцеллюлярного рака и  $52,71 \pm 20,86\%$  площади среза ткани холангиоцеллюлярного рака печени. У 80% больных в гепатоцеллюлярной карциноме и у 74,36% в холангиоцеллюлярной карциноме в опухолевых клетках установлена цитоплазматическая экспрессия TIMP-1. TIMP-1-иммунопозитивные клетки составляли  $21,94 \pm 6,27\%$  площади среза ткани гепатоцеллюлярного рака печени и  $33,05 \pm 13,85\%$  площади среза ткани холангиоцеллюлярного рака печени. В обоих типах рака печени между высоким уровнем экспрессии опухолевыми клетками MMP-9 и низким уровнем экспрессии TIMP-1 отмечена прямая сильная корреляционная связь, что свидетельствует о высоком потенциале инвазивности и агрессивности гепатоцеллюлярной и холангиоцеллюлярной карциномы.

### Характеристика рівня експресії MMP-9 і TIMP-1 у гепатоцелюлярному та холангіоцелюлярному раку печінки

*В. О. Туманський, М. Д. Зубко*

З метою визначення рівня імуногістохімічної експресії MMP-9 та її тканинного інгібітора TIMP-1, а також площі імунопозитивних клітин у холангіоцелюлярному й гепатоцелюлярному раку печінки здійснили патогістологічне, гістохімічне й імуногістохімічне дослідження трепанобіоптатів печінки 94 хворих, серед них 55 (58,51%) пацієнтів страждали на гепатоцелюлярний рак печінки, 39 (41,49%) – на холангіоцелюлярний рак печінки. Рівень експресії імуногістохімічних маркерів пухлинними клітинами та площу імунопозитивних клітин у пухлині визначали фотоцифровою морфометрією. Встановили, що у 92,73% хворих на гепатоцелюлярну карциному та у 89,74% хворих на холангіоцелюлярну карциному у злоякісних клітинах визначалася цитоплазматична експресія MMP-9. MMP-9-імунопозитивні клітини становили  $59,33 \pm 22,57\%$  площі зрізу тканини гепатоцелюлярного раку та  $52,71 \pm 20,86\%$  площі зрізу тканини холангіоцелюлярного раку печінки. У 80% хворих у гепатоцелюлярній карциномі та у 74,36% в холангіоцелюлярній карциномі в пухлинних клітинах виявили цитоплазматичну експресію TIMP-1. TIMP-1-імунопозитивні клітини становили  $21,94 \pm 6,27\%$  площі зрізу тканини гепатоцелюлярного раку печінки та  $33,05 \pm 13,85\%$  площі зрізу тканини холангіоцелюлярного раку печінки. В обох типах раку печінки між високим рівнем експресії пухлинними клітинами MMP-9 і низьким рівнем експресії TIMP-1 визначили прямий сильний кореляційний зв'язок, що свідчить про високий потенціал інвазивності й агресивності гепатоцелюлярної та холангіоцелюлярної карциноми.

**Ключові слова:** гепатоцелюлярна карцинома, холангіоцелюлярна карцинома, TIMP-1, MMP-9.*Патологія. – 2015. – №1 (33). – С. 20–25*

### Characteristics of the expression level of MMP-9 and TIMP-1 in hepatocellular and cholangiocellular liver carcinoma

*V. A. Tumanskiy, M. D. Zubko*

**Aim.** In order to determine the expression level of immunohistochemical markers of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and its tissue inhibitor TIMP-1, and area of immunopositive cells a comprehensive histopathological, histological and immunohistochemical study of liver biopsy specimens was carried out in 94 patients, of which 55 (58.51%) patients had hepatocellular carcinoma and 39 (41.49%) – cholangiocellular carcinoma of liver.

**Methods and results.** In 92.73% of patients with hepatocellular carcinoma and in 89.74% of patients with cholangiocellular carcinoma in malignant cells cytoplasmic expression of MMP-9 was determined. MMP-9 immunopositive cells took  $59,33 \pm 22,57\%$  of area of the tissue section of hepatocellular carcinoma and  $52,71 \pm 20,86\%$  of area of the tissue section of cholangiocellular liver cancer. In 80% of hepatocellular carcinoma patients and 74.36% of patients with cholangiocellular carcinoma in tumor cells cytoplasmic expression of TIMP-1 was revealed. TIMP-1 immunopositive cells constituted  $21,94 \pm 6,27\%$  of area of the tissue section of hepatocellular liver cancer and  $33,05 \pm 13,85\%$  of area of the tissue section of holangiocellular liver cancer.

**Conclusion.** In both types of liver cancer direct strong relationship was noted between high levels of expression of MMP-9 by the tumor cells and low expression of TIMP-1, which indicates high invasive potential and aggressiveness of hepatocellular carcinoma and cholangiocellular carcinoma.

**Key words:** Hepatocellular Carcinoma, Cholangiocellular Carcinoma, Mouse TIMP-1 Protein, Mouse MMP-9 Protein.*Pathologia. 2015; №1 (33): 20–25*

Семейство матриксных металлопротеиназ (ММР) представляет собой более чем 20 секретируемых или связанных с поверхностью клетки цинк-зависимых эндопептидаз, способных разрушать внеклеточный фибриллярно-молекулярный матрикс и базальные мембраны, активность которых регулируется тканевыми ингибиторами матриксных металлопротеиназ (ТИМР) [1]. В зависимости от структурно-функциональных особенностей и субстратной специфичности ММР выделяют несколько их подсемейств: коллагеназы широкого спектра действия (ММР-1, 8, 13), желатиназы, или специфические коллагеназы коллагена IV типа (ММР-2 и 9), стромелизины (ММР-3 и 10), матрилизины (ММР-7, ММР-26) и ММР мембранного типа [2]. Известно несколько механизмов регуляции активности ММР в тканях, которые работают на различных уровнях, в том числе на уровне транскрипции генов клеток-продуцентов ММР, на уровне активации ММР-проферментов и торможения тканевыми ингибиторами активных металлопротеиназ. Подавляющий механизм ТИМР заключается в том, что они в эквимолярном соотношении связываются с каталитическим сайтом активного фермента ММР, препятствуя его активности, а также с карбоксильным концом ММР-профермента, предотвращая его активацию [3]. Таким образом, взаимодействия ММР и ТИМР играют важную роль в поддержании баланса внеклеточного волокнисто-молекулярного матрикса органов.

В последнее десятилетие появились публикации о наличии экспрессии ММР и ТИМР клетками гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) и холангиоцеллюлярной карциномы (ХЦК) печени [3,4]. Учитывая физиологические функции ММР, экспрессию этих ферментов в опухоли ассоциировали с инвазивным ростом опухолевых клеток в окружающую ткань, с их внедрением в сосуды и с метастазированием гепатоцеллюлярного рака [5–7], а также холангиоцеллюлярного рака печени [8,9]. Тем не менее, значение разных уровней экспрессии этих ферментов клетками опухоли и окружающей ткани изучено недостаточно.

#### **Цель работы**

Определение соотношения уровней экспрессии ММР-9 и ТИМР-1, а также площади иммунопозитивных клеток в холангиоцеллюлярном и гепатоцеллюлярном раке печени.

#### **Материалы и методы исследования**

Проведено комплексное патогистологическое, гистохимическое и иммуногистохимическое исследование биоптатов печени 94 больных, среди которых 55 (58,51%) страдали ГЦК, 39 (41,49%) – ХЦК печени. Средний возраст больных ГЦК составил 61,94±12,16 года (26–81 год), ХЦК – 58,46±11,52 года (33–83 года). В контрольной группе исследовали биоптаты печени 5 умерших от соматических заболеваний без клинико-биохимических и морфологических признаков поражения печени.

Столбики трепанобиоптатов печени больных ГЦК и ХЦК фиксировали в забуференном 10% формалине и

заливали в парафин. На ротационном микротоме HM-3600 (MICROM Laborgerate GmbH, ФРГ) изготавливали серийные срезы толщиной 3–4 мкм для их окраски гематоксилином и эозином, по ван Гизону и Массон-триколор, а также для ИГХ-исследований.

В соответствии со стандартизированными протоколами в парафиновых срезах ткани печени после температурного демаскирования антигенов и подавления активности эндогенной пероксидазы проведены ИГХ-исследования с использованием соответствующих первичных антител и системы визуализации DAKO EnVision+ System («ДАКО», Дания) с диаминобензидином (DAB). Экспрессию клетками печени матриксной металлопротеиназы-9 (ММР-9) и ее тканевого ингибитора ТИМР-1 осуществляли с использованием поликлональных антител Rb a-Hu MMP-9 («Thermo Fisher Scientific Inc.», США) и моноклональных антител Mo a-Hu TIMP-1 Ab-2, Clone 102D1 («Thermo Fisher Scientific Inc.», США).

Уровень экспрессии иммуногистохимических маркеров опухолевыми клетками и площадь иммунопозитивных опухолевых клеток определяли фотоцифровой морфометрией. Для количественной оценки уровня экспрессии ММР-9 и ТИМР-1 в каждом наблюдении рака печени микропрепараты с соответствующей иммунопозитивной реакцией фотографировали цифровой фотокамерой «Olympus 3040» (Япония) в микроскопе AxioPlan 2 («Carl Zeiss», ФРГ) при увеличении ×200 в 5 полях зрения и анализировали с использованием медицинской программы обработки цифровых изображений Image J [10]. В плагине Colour Deconvolution этой программы во встроенной схеме анализа «гематоксин+DAB» по уровню DAB-окрашивания определяли уровень экспрессии соответствующих иммуногистохимических маркеров. Интенсивность экспрессии изучаемых маркеров градуировали количественно в условных единицах оптической плотности (УЕОП) от 0 (белый) до 255 (черный) и разбивали на 4 категории: негативная реакция – 0–20 УЕОП; низкий уровень экспрессии – 21–50 УЕОП; умеренный уровень экспрессии – 51–100 УЕОП; высокий уровень экспрессии – более 100 УЕОП.

Для морфометрического измерения площади, занимаемой ММР-9 и ТИМР-1-иммунопозитивными клетками в цифровых иммуногистохимических изображениях гепато- и холангиоцеллюлярного рака печени с использованием программы Image J определяли суммарную площадь экспрессии каждого маркера, которая представляла собой процентное соотношение числа пикселей иммунопозитивного цифрового изображения соответствующего маркера к общему числу пикселей в изображении, выраженному в %.

Статистическую обработку результатов проводили на персональном компьютере в программе «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoft Inc., лицензия № AXXR712D833214FAN5). Вычисляли среднее значение (M), среднее квадратическое отклонение (σ), стандартную ошибку репрезентативности среднего зна-

чения (m), рассчитывали 95% доверительный интервал среднего значения. Корреляционную связь определяли с расчетом коэффициента Пирсона (для непараметрических данных). Результаты считали достоверными при  $p < 0,05$ .

### Результаты и их обсуждение

Иммуногистохимические исследования показали, что у 92,73% больных в злокачественных клетках ГЦК печени определена цитоплазматическая экспрессия MMP-9. Почти у половины обследованных преобладал умеренный уровень экспрессии MMP-9 в ГЦК, он установлен у 49,09% больных –  $72,28 \pm 20,3$  УЕОП, у 25,46% пациентов уровень экспрессии был низким и составлял  $37,21 \pm 7,25$  УЕОП, а у 18,18% больных отмечен высокий уровень экспрессии MMP-9 клетками ГЦК, составлявший  $167,71 \pm 46,61$  УЕОП. У 7,27% больных экспрессия MMP-9 в клетках ГЦК была крайне низкой и составляла  $8,00 \pm 2,12$  УЕОП, что расценивали как негативную экспрессию.

При фотоцифровой морфометрии установлено, что площадь, занимаемая MMP-9-иммунопозитивными клетками, составляла в среднем  $59,33 \pm 22,57\%$  площади среза ткани гепатоцеллюлярного рака. Одиночные MMP-9-позитивные опухолевые клетки или их группы обнаружены как в центре опухоли, так и на ее периферии. Кроме этого, у 36,36% больных установлен низкий либо умеренный уровень цитоплазматической экспрессии MMP-9 в гепатоцитах перитуморозной ткани печени.

Y. Ishii et al. [11] также наблюдали экспрессию MMP-9 в клетках ГЦК в 50,0% наблюдений, в 43,4% случаев – экспрессию MMP-9 в окружающей неопухолевающей ткани. Yan Zhang et al. [12] положительную экспрессию MMP-9 в ГЦК обнаружили у 76,68% пациентов. По данным D. Nart et al. [13], положительная экспрессия MMP-9 отмечена в 74,2% ГЦК, низкий уровень экспрессии этого фермента установлен в 30,3% наблюдений, а умеренный уровень экспрессии MMP-9 – в 43,8% случаев.

Повышенный уровень MMP в ГЦК играет важную роль в росте этой опухоли, в опухолевом ангиогенезе и метастазировании [13–16]. Секретируя MMP, клетки ГЦК расщепляют коллаген IV типа, который является основным компонентом базальных мембран печени [15], проникают во внеклеточный матрикс и мигрируют к кровеносным сосудам, что приводит к инвазивному распространению опухоли в печени и быстрому прогрессированию заболевания. Поэтому стало аксиомой, что повышенная экспрессия MMP-9 коррелирует с большим размером ГЦК и ее высокой агрессивностью [17, 18].

При исследовании экспрессии TIMP-1 мы установили, что экспрессия этого тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ в клетках ГЦК отмечена у 80% больных. Высокий уровень экспрессии TIMP-1 ( $170,5 \pm 41,43$  УЕОП) установлен в 18,18% случаев ГЦК, умеренный уровень экспрессии этого фермента ( $85 \pm 16,69$  УЕОП) – у 14,55% больных ГЦК, низкий уровень экспрессии TIMP-1 ( $28,35 \pm 5,89$  УЕОП) – у 47,27% больных ГЦК. TIMP-1-иммунопозитивные клетки обнаружены и в центре, и на периферии опухоли; они занимали  $21,94 \pm 6,27\%$  площади

среза ткани ГЦК, т.е. меньшую площадь, чем MMP-9-позитивные клетки в этой опухоли. Young-Eun Joo et al. [19] обнаружили экспрессию TIMP-1 не только в ткани ГЦК, но и в прилежащей неопухолевающей ткани, при этом очевидных различий между уровнем экспрессии TIMP-1 в этих участках не установили.

Некоторые авторы указывают, что высокая экспрессия MMP и TIMP в ткани ГЦК может быть также обусловлена взаимодействием опухолевых клеток с внеклеточным матриксом опухоли. Имеются данные, что аккумуляцию внеклеточного матрикса наблюдают в 90% ГЦК печени человека, и в нем участвуют MMP-1, 2, 9 и 13, а также TIMP-1 и 2. Так, N. Theret et al. [5] показали, что накопление внеклеточного матрикса в опухоли вызывает избыточную экспрессию MMP-2 как клетками гепатоцеллюлярной карциномы, так и мезенхимными клетками печени. Ремоделирование внеклеточного матрикса ГЦК обычно ассоциируется с прогрессией опухоли и возрастанием ее метастатического потенциала [5, 20].

При иммуногистохимическом анализе ХЦК печени выяснили, что у 89,74% больных в опухолевых клетках определялась цитоплазматическая экспрессия MMP-9. Высокий ( $134,04 \pm 21,47$  УЕОП) и умеренный ( $74,83 \pm 14,64$  УЕОП) уровень экспрессии MMP-9 клетками ХЦК установлен у одинакового процента больных (по 30,77%), а низкий уровень экспрессии MMP-9 ( $32,88 \pm 9,60$  УЕОП) отмечен у 28,21% пациентов. В 10,25% случаев в ХЦК определен крайне низкий уровень экспрессии MMP-9 ( $9,16 \pm 3,70$  УЕОП), расцененный как негативный. По данным фотоцифрового анализа MMP-9, иммунопозитивные опухолевые клетки составляли в среднем  $52,71 \pm 20,86\%$  среза ткани холангиоцеллюлярного рака. При этом у 5,12% больных ХЦК печени отмечена слабая позитивная экспрессия MMP-9 в цитоплазме гепатоцитов, расположенных вблизи опухоли.

Частота позитивной экспрессии MMP-9 в ХЦК, установленная другими исследователями, широко варьирует и колеблется от 43% [21] до 73% [8] и даже до 95% [9]. K. Itatsu et al. [22] отметили позитивную иммуногистохимическую реакцию клеток ХЦК с MMP-9 у 47,5% больных, а с MMP-7 – у 75,8%.

По результатам наших исследований, положительная экспрессию TIMP-1 обнаружена в клетках ХЦК 74,36% пациентов. Высокий уровень экспрессии TIMP-1 ( $137,42 \pm 12,66$  УЕОП) в ХЦК определен у 17,95% больных, умеренный ( $75,75 \pm 11,68$  УЕОП) – у 20,51%, низкий уровень экспрессии TIMP-1 ( $34,77 \pm 7,63$  УЕОП) в ХЦК – у 35,9% пациентов. Площадь TIMP-1 иммунопозитивных клеток составила  $33,05 \pm 13,85\%$  площади среза ткани холангиоцеллюлярного рака печени. Положительную экспрессию TIMP-1 в прилежащей неопухолевающей ткани у больных ХЦК печени мы не установили.

Сравнительный анализ уровней экспрессии MMP-9 и TIMP-1 в ГЦК и ХЦК показал, что в обоих типах первичного рака печени MMP-9 иммунопозитивные клетки занимали более половины площади среза опухоли, высокий и средний уровень экспрессии MMP-9 в ГЦК и в ХЦК отмечен более чем у 60% больных (табл. 1).

**Основные параметры экспрессии MMP-9 и TIMP-1  
в гепатоцеллюлярной и холангиоцеллюлярной карциноме печени**

Основные параметры экспрессии ферментов в опухоли	Гепатоцеллюлярная карцинома		Холангиоцеллюлярная карцинома	
	MMP-9	TIMP-1	MMP-9	TIMP-1
Процент больных с экспрессией ферментов в опухоли	92,73%	80%	89,74%	74,36%
Площадь иммунопозитивных клеток в опухоли	59,33±22,57%	21,94±6,27%	52,71±20,86%	33,05±13,85%
Процент больных с высоким уровнем экспрессии ферментов клетками опухоли	18,18%	18,18%	30,77%	17,95%
Процент больных с умеренным уровнем экспрессии ферментов клетками опухоли	49,09%	14,55%	30,77%	20,51%
Процент больных с низким уровнем экспрессии ферментов клетками опухоли	25,46%	47,27%	28,21%	35,9%

Высокий либо умеренный уровень экспрессии MMP-9 клетками гепатоцеллюлярного и холангиоцеллюлярного рака печени отмечен у больных с низким уровнем экспрессии TIMP-1 в этих же типах опухолей.

Исследования, проведенные в течение последнего десятилетия, показали, что MMP играют ключевую роль в процессах ангиогенеза, быстрого роста, инвазии и метастазирования холангио- и гепатоцеллюлярного рака печени [5,9,11]. Z.H. Gao et al. [7] сделали вывод, что повышенный уровень экспрессии MMP-1, 7 и снижение экспрессии E-кадгерина в гепатоцеллюлярной карциноме, развившейся фоне цирроза печени, создает более благоприятные условия для инвазии и метастазирования по сравнению с аналогичной опухолью в нецирротической печени. При низком уровне MMP-9 и 3 в низкодифференцированной гепатоцеллюлярной карциноме внепеченочные метастазы развиваются реже, чем у больных ГЦК с высоким уровнем MMP-9 и 3 в опухоли. При избыточной экспрессии MMP мембранного типа в ГЦК высока вероятность развития внепеченочных метастазов этой опухоли [6]. Qi Sun et al. [23] установили, что высокий уровень MMP-9 в холангиоцеллюлярной карциноме коррелирует с опухолевой прогрессией и неблагоприятным прогнозом. Пациенты с высоким уровнем экспрессии MMP-9 в ХЦК отличались низкой продолжительностью жизни, в отличие от пациентов с отрицательным или низким уровнем экспрессии MMP-9.

Корреляционный анализ, проведенный в нашем исследовании, показал: у больных ГЦК и ХЦК между

высоким уровнем экспрессии MMP-9 и низким уровнем экспрессии TIMP-1 опухолевыми клетками отмечена прямая сильная связь (коэффициент Пирсона –  $r=+0,67$  и  $r=+0,85$  соответственно).

Таким образом, наши данные о высоком или умеренном уровне экспрессии MMP-9 и одновременно низком уровне экспрессии TIMP-1 свидетельствуют о высоком потенциале инвазивности и агрессивности ГЦК и ХЦК.

#### Выводы

1. У 92,73% больных гепатоцеллюлярной карциномой и 89,74% больных холангиоцеллюлярной карциномой в злокачественных клетках определена цитоплазматическая экспрессия MMP-9. MMP-9-иммунопозитивные клетки составляли 59,33±22,57% площади среза ткани гепатоцеллюлярного рака и 52,71±20,86% площади среза ткани холангиоцеллюлярного рака печени.

2. У 80% больных в гепатоцеллюлярной карциноме и 74,36% больных в холангиоцеллюлярной карциноме в опухолевых клетках установлена цитоплазматическая экспрессия TIMP-1. TIMP-1-иммунопозитивные клетки составляли 21,94±6,27% площади среза ткани гепатоцеллюлярного рака печени и 33,05±13,85% площади среза ткани холангиоцеллюлярного рака печени.

3. В гепатоцеллюлярной и холангиоцеллюлярной карциноме между высоким уровнем экспрессии опухолевыми клетками MMP-9 и низким TIMP-1 установлена прямая сильная связь (коэффициент Пирсона –  $r=+0,67$  и  $r=+0,85$  соответственно), что свидетельствует о высоком инвазивном потенциале этих опухолей.

#### Список литературы

1. Malemud C.J. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview / C.J. Malemud // *Front Biosci.* – 2006. – Vol. 11. – P. 1696–1701.
2. Visse R. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry / R. Visse, H. Nagase // *Circ Res.* – 2003. – Vol. 92(8). – P. 827–839.
3. Expression of Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs) in Hepatocellular Carcinoma / Joo, Y-E, Seo, Y-H, Lee, et al. // *Korean J Intern Med.* – 2000. – Vol. 15(3). – P. 171–178.
4. A matrix metalloproteinase inhibitor to treat unresectable cholangiocarcinoma / J.J. French, M.J. Midwinter, M.K. Bennett et al. // *HPB (Oxford).* – 2005. – Vol. 7(4). – P. 289–297.
5. Increased extracellular matrix remodeling is associated with tumor progression in human hepatocellular carcinomas / N. Theret, O. Musso, B. Turlin, et al. // *Hepatology.* – 2001. – Vol. 34(1). – P. 82–88.
6. Mechanism of metastasis by membrane type 1-matrix metalloproteinase in hepatocellular carcinoma / Y.C. Ip, S.T. Cheung, K.L. Leung, S.T. Fan // *World J Gastroenterol.* – 2005. – Vol. 11(40). – P. 6269–6276.
7. Association of E-cadherin, matrix metalloproteinases, and tissue inhibitors of metalloproteinases with the progression and metastasis of hepatocellular carcinoma / Z.H. Gao, M.S. Tretiakova, W.H. Liu, et al. // *Mod Pathol.* – 2006. – Vol. 19(4). – P. 533–540.
8. Expression of Epidermal Growth Factor Receptor, Apomucins, Matrix Metalloproteinases, and p53 in Rat and Human Cholangiocarcinoma / YY. Jan, TS. Yeh, JN. Yeh et al. // *Ann Surg.* – 2004. – Vol. 240(1). – P. 89–94.
9. Expression of epidermal growth factor receptor, ErbB2 and

- matrix metalloproteinase-9 in hepatolithiasis and cholangiocarcinoma / H.J. Kim, J.S. Kim, C.D. Kang et al. // *Korean J Gastroenterol.* – 2005. – Vol. 45(1). – P. 52–59.
10. Rasband W.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA / W.S. Rasband, J. Image Retrieved from <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997–2012.
  11. A Study on Angiogenesis-Related Matrix Metalloproteinase Networks in Primary Hepatocellular Carcinoma / Y. Ishii, Y. Nakasato, S. Kobayashi et al. // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* – 2003. – Vol. 22(3). – P. 461–470.
  12. Elevated expression levels of androgen receptors and matrix metalloproteinase-2 and -9 in 30 cases of hepatocellular carcinoma compared with adjacent tissues as predictors of cancer invasion and staging / Yan Zhang, Yucheng Shen, Bin Cao et al. // *Experimental and therapeutic medicine.* – 2015. – Vol. 9(3). – P. 905–908.
  13. Expression of matrix metalloproteinase-9 in predicting prognosis of hepatocellular carcinoma after liver transplantation / D. Nart, B. Yaman, F. Yilmaz et al. // *J Liver Transplantation.* – 2010. – Vol. 16(5). – P. 621–630.
  14. A role for matrix metalloproteinases and tumor host interaction in hepatocellular carcinomas / G.J. McKenna, Y. Chen, R.M. Smith et al. // *Am J Surg.* – 2002. – Vol. 183(5). – P. 588–594.
  15. Jiang Y.F. Recurrence or metastasis of HCC: predictors, early detection and experimental antiangiogenic therapy / Y.F. Jiang, Z.H. Yang, J.Q. Hu // *World J Gastroenterol.* – 2000. – Vol. 6(1). – P. 61–65.
  16. Enhanced migration of tissue inhibitor of metalloproteinase overexpressing hepatoma cells is attributed to gelatinases: relevance to intracellular signaling pathways / E. Roeb, A.K. Bosserhoff, S. Hamacher et al. // *World J Gastroenterol.* – 2005. – Vol. 11. – P. 1096–1104.
  17. Increased levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human hepatocellular carcinoma / E. Matsumoto, H. Nakatsukasa, K. Nouse et al. // *Liver Int.* – 2004. – Vol. 24(4). – P. 379–383.
  18. Кутихин А.Г. Прогностическая роль и молекулярно-биологические аспекты формирования капсулы гепатоцеллюлярной карциномы: обзор литературы / А.Г. Кутихин, Л.В. Начева, Ю.А. Магарилл // *Сибирский онкологический журнал.* – 2009. – №6(36). – С. 70–77.
  19. Expression of Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs) in Hepatocellular Carcinoma / Y.E. Joo, Y.H. Seo, W.S. Lee et al. // *Korean J Intern Med.* – 2000. – Vol. 15(3). – P. 171–178.
  20. Accumulation of extracellular matrix in the liver induces high metastatic potential of hepatocellular carcinoma to the lung / S. Sawada, K. Murakami, J. Murata et al. // *Int J Oncol.* – 2001. – Vol. 19(1). – P. 65–70.
  21. Expression of matrix metalloproteinase-9 in surgically resected intrahepatic cholangiocarcinoma / K. Shirabe, M. Shimada, K. Kajiyama et al. // *Surgery.* – 1999. – Vol. 126(5). – P. 842–846.
  22. Expression of matrix metalloproteinase 7 is an unfavorable postoperative prognostic factor in cholangiocarcinoma of the perihilar, hilar, and extrahepatic bile ducts / K. Itatsu, Y. Zen, J. Yamaguchi et al. // *Hum Pathol.* – 2008. – Vol. 39(5). – P. 710–719.
  23. High expression of matrix metalloproteinase-9 indicates poor prognosis in human hilar cholangiocarcinoma / Qi Sun, Chuanzong Zhao, Leizhou Xia et al. // *Int J Clin Exp Pathol.* – 2014. – Vol. 7(9). – P. 6157–6164.
  3. Joo, Y-E, Seo, Y-H, Lee, W-S, Kim, H-S, Choi, S-K, Rew, J-S, et al. (2000) Expression of Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs) in Hepatocellular Carcinoma. *Korean J Intern Med.*, 15(3), 171–178.
  4. French, J. J., Midwinter, M. J., Bennet, M. K., Manas, D. M., & Charley, R. M. (2005) A matrix metalloproteinase inhibitor to treat unresectable cholangiocarcinoma. *HPB (Oxford)*, 7(4), 289–291. doi: 10.1080/13651820510042246.
  5. Theret, N., Musso, O., Turlin, B., Lotrian, D., Bioulac-Sage, P., Campion, J.P., et al. (2001) Increased extracellular matrix remodeling is associated with tumor progression in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology*, 34(1), 82–88.
  6. Ip, Y. C., Cheung, S. T., Leung, K. L., Fan, S. T. (2005) Mechanism of metastasis by membrane type 1-matrix metalloproteinase in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 11(40), 6269–6276. doi: 10.3748/wjg.v11.i40.6269.
  7. Gao, Z. H., Tretiakova, M. S., Liu, W. H., Gong, C., Farris, P. D., & Hart, J. (2006) Association of E-cadherin, matrix metalloproteinases, and tissue inhibitors of metalloproteinases with the progression and metastasis of hepatocellular carcinoma. *Mod Pathol.*, 19(4), 533–540.
  8. Jan, Y.Y., Yeh, T.S., Yeh, J.N., Yang, H.R., & Chen, M.F. (2004) Expression of Epidermal Growth Factor Receptor, Apomucins, Matrix Metalloproteinases, and p53 in Rat and Human Cholangiocarcinoma. *Ann Surg*, 240(1), 89–94. doi: 10.1097/01.sla.0000129492.95311.f2.
  9. Kim, H. J., Kim, J. S., Kang, C. D., Lee, S. J., Kim, J. Y., Yeon, J. E., et al. (2005). Expression of epidermal growth factor receptor, ErbB2 and matrix metalloproteinase-9 in hepatolithiasis and cholangiocarcinoma. *Korean J Gastroenterol.*, 45(1), 52–59.
  10. Rasband, W. S. & Image J. U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA Retrieved from <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997–2012.
  11. Ishii, Y., Nakasato, Y., Kobayashi, S., Yamazaki, Y., & Aoki, T. (2003) A Study on Angiogenesis-Related Matrix Metalloproteinase Networks in Primary Hepatocellular Carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 22(3), 461–470.
  12. Yan, Zhang, Yucheng, Shen, Bin, Cao, Aiting, Yan, & Haoming, Ji (2015) Elevated expression levels of androgen receptors and matrix metalloproteinase-2 and -9 in 30 cases of hepatocellular carcinoma compared with adjacent tissues as predictors of cancer invasion and staging. *Experimental and therapeutic medicine*, 9(3), 905–908.
  13. Nart, D., Yaman, B., Yilmaz, F., Zeytinlu, M., Karasu, Z., Kilic, M. (2010) Expression of matrix metalloproteinase-9 in predicting prognosis of hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *J Liver Transplantation*, 16(5), 621–630. doi: 10.1002/lt.22028.
  14. McKenna, G. J., Chen, Y., Smith, R. M., Meneghetti, A., Ong, C., McMaster, R. et al. (2002) A role for matrix metalloproteinases and tumor host interaction in hepatocellular carcinomas. *Am J Surg.*, 183(5), 588–594. doi: 10.1016/S0002-9610(02)00833-4.
  15. Jiang, Y. F., Yang, Z. H., Hu, J. Q. (2000) Recurrence or metastasis of HCC: predictors, early detection and experimental antiangiogenic therapy. *World J Gastroenterol*, 6(1), 61–65.
  16. Roeb, E., Bosserhoff, A.K., Hamacher, S., Jansen, B., Dahmen, J., Wagner, S. et al. (2005) Enhanced migration of tissue inhibitor of metalloproteinase overexpressing hepatoma cells is attributed to gelatinase: relevance to intracellular signaling pathways. *World J Gastroenterol*, 11, 1096–1104. doi: 10.3748/wjg.v11.i8.1096.
  17. Matsumoto, E., Nakatsukasa, H., Nouse, K., Kobayashi, Y., Nakamura, S., Suzuki, M., et al. (2004) Increased levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human hepatocellular carcinoma. *Liver Int.*, 24(4), 379–383. doi: 10.1111/j.1478-3231.2004.0923.x.

## References

1. Malesud, C. J. (2006) Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci*, 11, 1696–1701. doi: 10.2741/1915.
2. Visse, R., & Nagase, H. (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*, 92(8), 827–839. doi: 10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D.



18. Kutikhin, A. G., Natcheva, L. V., Magarill, Yu. A. (2009) Prognosticheskaya rol' i molekulyarno-biologicheskie aspekty formirovaniya kapsuly gepatocellyulyarnoj karcinomy: obzor literatury [Prognostic role and molecular-biological aspects of hcc capsule formation: review]. *Sibirskij onkologicheskij zhurnal*, 6(36), 70–77. [in Russian].
19. Joo, Y. E., Seo, Y. H., Lee, W. S., Kim, H. S., Choi, S.K., Rew, J.S., et al. (2000) Expression of Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs) in Hepatocellular Carcinoma. *Korean J Intern Med*, 15(3), 171–178.
20. Sawada, S., Murakami, K., Murata, J., Tsukada, K., & Saiki, I. (2001) Accumulation of extracellular matrix in the liver induces high metastatic potential of hepatocellular carcinoma to the lung. *Int J Oncol*, 19(1), 65–70. doi: 10.3892/ijo.19.1.65.
21. Shirabe, K., Shimada, M., Kajiyama, K., Hasegawa, H., Gion, T., Ikeda, Y., et al. (1999) Expression of matrix metalloproteinase-9 in surgically resected intrahepatic cholangiocarcinoma. *Surgery*, 126(5), 842–846.
22. Itatsu, K., Zen, Y., Yamaguchi, J., Ohira, S., Ishikawa, A., Ikeda, H., et al. (2008) Expression of matrix metalloproteinase 7 is an unfavorable postoperative prognostic factor in cholangiocarcinoma of the perihilar, hilar, and extrahepatic bile ducts. *Hum Pathol*, 39(5), 710–719. doi: 10.1016/j.humpath.2007.09.016.
23. Qi, Sun, Chuanzong, Zhao1, Leizhou, Xia , Zhaobin, He, Zhihua, Lu , Chuan, Liu, et al. (2014) High expression of matrix metalloproteinase-9 indicates poor prognosis in human hilar cholangiocarcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*, 7(9), 6157–6164.

---

**Сведения об авторах:**

Туманский В.А., д. мед. н., профессор, зав. каф. патологической анатомии и судебной медицины, Запорожский государственный медицинский университет, E\_mail: tumanskiy@zsmu.zp.ua.

Зубко М.Д., ассистент каф. патологической анатомии и судебной медицины, Запорожский государственный медицинский университет.

**Відомості про авторів:**

Туманський В.О., д. мед. н., професор, зав. каф. патологічної анатомії та судової медицини, Запорізький державний медичний університет, E\_mail: tumanskiy@zsmu.zp.ua.

Зубко М.Д., асистент каф. патологічної анатомії та судової медицини, Запорізький державний медичний університет.

**Information about authors:**

Tumanskiy V.A., MD, PhD, DSci, Professor, Head of the Department of Pathologic Anatomy and Forensic Medicine, Zaporizhzhya State Medical University, E\_mail: tumanskiy@zsmu.zp.ua.

Zubko M.D., Assistant of the Department of Pathologic Anatomy and Forensic Medicine, Zaporizhzhya State Medical University.

---

Надійшла в редакцію 02.04.2015 р.

С. В. Базалицька, А. М. Романенко

## Гістопатологічні зміни та імуногістохімічна експресія протеїну ubiquitin у перитуморальній тканині при герміногенних пухлинах яєчка

ДУ «Інститут урології НАМН України», м. Київ

**Ключові слова:** сім'яні канальці, пухлини яєчка, білки.

З метою визначення морфологічних змін та особливостей імуногістохімічної експресії протеїну ubiquitin в перитуморальній тканині яєчка, які можна охарактеризувати як передракові, обстежили 40 хворих на герміногенні пухлини яєчка. У перитуморальній тестикулярній тканині у спостереженнях із порушенням сперматогенезу, які становлять 95%, виявили посилення процесів убіквітинації в сім'яних канальцях, що свідчить про інтенсивні процеси протеолізу великої кількості пошкоджених внутрішньоклітинних білків, появу атипичних статевих клітин (TIN), які відрізняються від нормальних клітин сперматогенезу вірогідно нижчими показниками ядерної та цитоплазматичної експресії протеїну ubiquitin, а також порушення процесів убіквітинації в клітинах Лейдига у вигляді посилення цитоплазматичної експресії та майже повного зникнення ядерної експресії протеїну ubiquitin. Результати свідчать про важливу роль структурних і функціональних порушень компонентів убіквітин-протеолітичної системи на початкових етапах канцерогенезу тестикулярної тканини.

### Гистопатологические изменения и иммуногистохимическая экспрессия протеина ubiquitin в перитуморальной ткани при герминогенных опухолях яичка

С. В. Базалицька, А. М. Романенко

С целью определения морфологических изменений и особенностей иммуногистохимической экспрессии протеина ubiquitin в перитуморальной ткани яичка, которые можно охарактеризовать как предраковые, обследованы 40 пациентов с герминогенными опухолями яичка. В перитуморальной тестикулярной ткани в наблюдениях с нарушением сперматогенеза, которые составляют 95%, установлено усиление процессов убиквитинации в семенных канальцах, свидетельствующее об интенсивных процессах протеолиза большого количества поврежденных внутриклеточных белков, появление атипичных половых клеток (TIN), которые отличаются от нормальных клеток сперматогенеза достоверно более низкими показателями ядерной и цитоплазматической экспрессии протеина ubiquitin, а также нарушение процессов убиквитинации в клетках Лейдига в виде усиления цитоплазматической экспрессии и почти полного исчезновения ядерной экспрессии протеина ubiquitin. Результаты свидетельствуют о важной роли структурных и функциональных нарушений компонентов убиквитин-протеолитической системы на начальных этапах канцерогенеза в тестикулярной ткани.

**Ключевые слова:** семенные канальцы, опухоли яичка, белки.**Патология.** – 2015. – №1 (33). – С. 26–30

### Histopathological features and protein ubiquitin immunohistochemical expression in peritumoral tissue of the testicular germ cell tumors

S. V. Bazalytska, A. M. Romanenko

**Aim.** For the purpose of determination of characteristic morphological changes as well as the immunohistochemical protein Ubiquitin expression in peritumoral testicular tissue, which could be characterized as precancer lesions, the 40 patients with testicular germ cell tumors (TGCT) were investigated.

**Methods and results.** Peritumoral testicular tissue in patients with the spermatogenesis alteration (that was detected in 95% of cases) demonstrated: 1) the dramatic increase of ubiquitination processes in seminiferous tubules, confirming the intensive proteolysis of the damaged intracellular proteins, 2) occurrence of atypical germ cells (TIN), which differ from the normal spermatogenesis cells by the authentically lower levels of the nuclear and cytoplasmatic protein Ubiquitin expression, 3) alteration of ubiquitination processes in Leydig cells with the significant increase of the protein Ubiquitin cytoplasmatic expression and the total disappearance of protein Ubiquitin nuclear expression.

**Conclusion.** Our results show the important role of the structural and functional ubiquitin-proteolysis system components alterations at the initial stages of the testicular tissue carcinogenesis.

**Key words:** Ovarian Neoplasms, Seminiferous Tubules, Proteins, TIN.**Pathologia.** 2015; №1 (33): 26–30

Значне поширення захворюваності на герміногенні пухлини яєчка (ГПЯ), які в Україні виявляють у 3–4 випадках на 100 тис. чоловічого населення (четверте місце серед причин летальності від онкологічних захворювань молодих чоловіків [1]) зумовлює актуальність досліджень на молекулярному рівні передракових змін тканини яєчка, що є початковими етапами канцерогенезу.

За відкриття механізму внутрішньоклітинного розщеплення білків, який дістав назву убіквітин-залежного протеолізу, та дослідження процесів убіквітинації авто-

рам Аарону Чехановеру та Авраму Глікману присудили Нобелівську премію (2004 р.).

Серед білків, які підлягають убіквітин-залежному протеолізу, можна назвати такі найважливіші субстрати: регулятори клітинного циклу, компоненти різних сигнальних шляхів, мутовані білки, білки, що пошкоджені посттрансляційно. Коли необхідність у певному білку відпадає, у клітині починає діяти механізм, який забезпечує припинення функціонування та деградацію саме цього білка. Розрізняють 2 основні фази цього

процесу: ковалентне приєднання поліубіквітинового ланцюга до білка, який підлягає деградації, та власне деградація білка у протеасомі. Поліубіквітиновий ланцюжок «пришивається» до того білка, чия доля вже визначена, оскільки він несе в собі ознаки смерті – специфічні сигнали, що вмикають процес деградації. Саме ці сигнали впізнають специфічні убіквітинлігази, з якими субстратні білки зв'язуються перед убіквітинізацією [2,3,15].

Виявили, що порушення процесів убіквітинації відіграють вагомую роль у патогенезі багатьох захворювань людини, зокрема при спадкових хворобах, дистрофічно-дегенеративних процесах, чоловічій неплідності та канцерогенезі, оскільки система убіквітин-протеасомного протеолізу залучена у процеси розвитку та диференціації клітин, перебіг проліферації, реакції клітин на стрес і пошкодження, а також у процеси малігнізації [3]. Враховуючи це, можна передбачити, що структурні та функціональні зміни компонентів убіквітин-протеасомної системи можуть відігравати важливу роль і в канцерогенезі тестикулярної тканини.

#### Мета роботи

Визначити морфологічні зміни та особливості імуногістохімічної експресії протеїну ubiquitin, які можна охарактеризувати як передракові, в перитуморальній тканині яєчка хворих на ГПЯ.

#### Пацієнти і методи дослідження

Обстежили 40 хворих, яким виконали орхіектомію у клініці онкоурології ДУ «Інститут урології НАМН України» і встановили клінічний діагноз згідно з класифікацією TNM. Середній вік хворих становив 27,6 року (від 17 до 59 років).

Гістологічно вивчали перитуморальну тканину яєчка та пухлину. Згідно з гістологічною класифікацією герміногенних пухлин яєчка, що ухвалена BOOЗ [7], семіному виявили у 19 пацієнтів, несеміномні пухлини – у 21 хворого, серед них ембріональний рак (EP) – у 5, злویкісну тератому – у 4, пухлину жовткового мішка (ПЖМ) – у 4, пухлини змішаної будови – у 8 пацієнтів. За класифікацією TNM у 19 пацієнтів діагностували I клінічну стадію, в 11 – II (7 – із семіномою і 5 – із несеміномними пухлинами), у 9 осіб виявили метастази в лімфовузлах ретроперитонеальні, межистінні та легені (III та IV стадій).

Імуногістохімічний (ІГХ) аналіз здійснили з використанням стандартного авідин-біотинного методу. Для ІГХ-дослідження біоптати перитуморальної тканини фіксували у 12% забуференому формаліні, заливали в парафін і виготовляли зрізи завтовшки до 5 мкм. Зрізи інкубували з первинними антитілами ubiquitin (DAKO, Glostrup, Данія) в розведенні 1:800. Проявляли препарати 1–2 хв у 0,05% розчині діамінбензидину (DAB), дофарбовували гематоксиліном і вміщували в канадський бальзам. Поширеність та інтенсивність ІГХ-реакції оцінювали за напівкількісним методом у балах [6], оцінювали від 0 до 3 балів. Загальний результат ІГХ-реакції визначали за показниками імуногістохімічного

коефіцієнта (ІГХК) від 0 до 9 балів, який одержували перемноженням оцінок поширеності (P) та інтенсивності (I) ІГХ-забарвлення за формулою  $ІГХК = P \times I$ . Слабку ІГХ-експресію протеїну ubiquitin визначали при  $ІГХК=1-3$ , помірну – при  $ІГХК=4-6$ , виразну – при  $ІГХК=7-9$ .

Виконали статистичний аналіз результатів за допомогою T-test (критерії Стьюдента) на базі комп'ютерної програми SPSS v.13.0 for Windows.

#### Результати та їх обговорення

Морфологічне дослідження перитуморальної тканини яєчка показало, що в тестикулярній тканині в 9 випадках виявили сім'яні каналці зі збереженням і частково пригніченим сперматогенезом (у 2 спостереженнях каналці не відрізнялись від нормальних незмінених, у 7 визначили нечисленні звивисті сім'яні каналці з ознаками збереженого пригніченого сперматогенезу, які розташовувались в оточенні сім'яних каналців із блокованим сперматогенезом).

Під час дослідження ІГХ-експресії протеїну ubiquitin у перитуморальній тканині у хворих зі збереженням і пригніченим сперматогенезом у клітинах Сертолі спостерігали виразне ядерне зафарбування ( $ІГХК=7-9$ ) в усіх 9 випадках (100%). Середнє значення ІГХК дорівнювало  $7,20 \pm 0,04$ . Цитоплазматична експресія протеїну ubiquitin у клітинах Сертолі була помірною ( $ІГХК=4-6$ ) в усіх випадках (100%). Середнє значення ІГХК дорівнювало  $5,70 \pm 0,09$ .

Клітини сперматогенного епітелію (сперматоцити I і II порядку та сперматиди) виявили слабку ( $ІГХК=1-3$ ) (2 спостереження) та помірну ( $ІГХК=4-6$ ) (7 спостережень) ядерну та цитоплазматичну експресію протеїну ubiquitin. Середнє значення ІГХК дорівнювало для сперматид  $3,30 \pm 0,09$  та  $4,20 \pm 0,09$  відповідно; для сперматоцитів I і II порядку –  $3,90 \pm 0,09$  та  $5,20 \pm 0,09$  відповідно.

У сперматогоніях визначили помірну ( $ІГХК=5-6$ ) (2 спостереження) та виразну ( $ІГХК=7-8$ ) ядерну та цитоплазматичну експресію протеїну Ubiquitin. Середнє значення ІГХК дорівнювало для сперматогоній  $7,40 \pm 0,09$  та  $7,20 \pm 0,09$  відповідно.

Відзначимо, що зрілі сперматозоїди характеризувались відсутністю імуногістохімічної експресії протеїну ubiquitin ( $ІГХК=0$ ) в усіх випадках (100%). У клітинах Лейдига слабку ядерну експресію (2–3 бали) спостерігали в усіх 9 випадках (100%). Середнє значення ІГХК дорівнювало  $2,30 \pm 0,04$ . Цитоплазматична експресія протеїну ubiquitin була помірною ( $ІГХК=4-6$ ) у 9 випадках (100%) цієї групи. Середнє значення ІГХК дорівнювало  $5,70 \pm 0,07$  (табл. 1).

У групі хворих із блоком сперматогенезу на рівні сперматогоній, сперматоцитів I і II порядку чи сперматид (26 пацієнтів) у клітинах Сертолі спостерігали виразне ядерне зафарбування ( $ІГХК=7-9$ ) в усіх спостереженнях (100%). Середнє значення ІГХК дорівнювало  $7,80 \pm 0,07$ . Цитоплазматична експресія протеїну ubiquitin у клітинах Сертолі була помірною ( $ІГХК=4-6$ ) у 14 (54%) та виразною ( $ІГХК=7-9$ ) у 12 випадках (46%). Середнє значення

ІГХК дорівнювало  $6,80 \pm 0,07$ . Клітини сперматогенного епітелію – сперматоцити I і II порядку та сперматиди виявляли помірну ядерну й цитоплазматичну експресію протеїну ubiquitin в усіх спостереженнях (100%) цієї групи, ІГХК становив 4–6 балів. Середнє значення ІГХК у ядрі та цитоплазмі дорівнювало у сперматоцитах  $4,30 \pm 0,01$  і  $5,90 \pm 0,01$  відповідно; у сперматидях –  $3,60 \pm 0,07$  і  $4,60 \pm 0,07$ . Сперматогонії характеризувались виразною ядерною та цитоплазматичною експресією протеїну ubiquitin в усіх спостереженнях (100%) цієї групи, ІГХК становив 7–9 балів. Середнє значення ІГХК у ядрі та цитоплазмі дорівнювало у сперматогоніях  $9,00 \pm 0,07$  і  $8,20 \pm 0,07$  відповідно.

У 23 випадках (60% спостережень) у просвітах окремих сім'яних каналців із блоком сперматогенезу різного ступеня серед клітин сперматогенного епітелію переважно спостерігали поодинокі розташовані атипичні статеві клітини великих розмірів овальної форми з гіпертрофованими округлими (іноді деформованими) гіперхромними ядрами та доволі вузькою світлою цитоплазмою, що належали до тестикулярної інтратубулярної неоплазії (testicular intratubular neoplasia – TIN). Атипичні статеві клітини характерного вигляду в каналцях розташовувалися серед клітин сперматогенного епітелію, які були значно меншого розміру, і клітин Сертолі в базальному компартменті. Іноді траплялися сім'яні каналці зменшеного діаметра з блокованим сперматогенезом на рівні сперматогоній із потовщеною склерозованою стінкою, у просвітах яких переважно розташовувалися клітини TIN і нечисленні сперматогонії та дистрофічно змінені клітини Сертолі. Рідко виявляли каналці зі значно потовщеною стінкою та різко звуженим просвітом, в якому визначали лише клітини TIN і клітини Сертолі. Клітини TIN, які встановили в перитуморальній тканині у 60% спостережень із блоком сперматогенезу, характеризувались помірною ядерною експресією протеїну ubiquitin (4–6 балів) у 18 (79%) спостереженнях, виразною ядерною експресією атипичних статевих клітинах була слабкою в 16 (68%), помірною – у 7 (32%) випадках цієї групи. Середнє значення ІГХК у цитоплазмі атипичних статевих клітин дорівнювало  $3,60 \pm 0,17$ .

У клітинах Лейдіга ядерна експресія протеїну ubiquitin відсутня (ІГХК=0) у 22 (83%) спостереженнях, у 4 (17%) випадках – слабка (ІГХК=1–3). Середнє значення ІГХК дорівнювало  $0,20 \pm 0,01$ . У 20 (77%) випадках спостерігали помірне цитоплазматичне зафарбування (ІГХК=4–6), в інших 6 (23%) спостереженнях відбувалося виразне цитоплазматичне зафарбування інтерстиційних ендокриноцитів (ІГХК=7–8). Середнє значення ІГХК дорівнювало  $6,90 \pm 0,15$  (табл. 1, рис. 1).

У хворих, у перитуморальній тканині яєчка яких виявляли «лише клітини Сертолі» (5 пацієнтів), у клітинах Сертолі спостерігали виразне ядерне та цитоплазматичне зафарбування протеїну ubiquitin (ІГХК=7–9) в усіх спостереженнях (100%). Середнє значення ІГХК дорівнювало  $8,90 \pm 0,04$  та  $8,40 \pm 0,06$  відповідно. У клітинах Лейдіга ядерна експресія протеїну ubiquitin відсутня

(ІГХК=0) у 3 (60%) спостереженнях, у 2 (40%) випадках визначили слабке ядерне зафарбування (ІГХК=1–2). Середнє значення ІГХК дорівнювало  $0,10 \pm 0,02$ . У 2 (40%) випадках визначили помірне цитоплазматичне зафарбування (ІГХК=4–6), у 3 (60%) – виразну цитоплазматичну експресію (ІГХК=7–9). Середнє значення ІГХК дорівнювало  $7,80 \pm 0,18$  (табл. 1).

Таблиця 1

### ІГХК експресії протеїну ubiquitin в перитуморальній тканині яєчка у хворих на ГПЯ

	Збережений сперматогенез (n=9)	Блок сперматогенезу (n=26)	Синдром «лише клітини Сертолі» (n=5)
Сперматозоїди:			
ядро	0	0	-
цитоплазма	0	0	-
Сперматиди:			
ядро	$3,3 \pm 0,09$	$3,6 \pm 0,17$	-
цитоплазма	$4,2 \pm 0,09$	$4,6 \pm 0,17$	-
Сперматоцити:			
ядро	$3,9 \pm 0,09^*$	$4,3 \pm 0,01^*$	-
цитоплазма	$5,2 \pm 0,09^*$	$5,9 \pm 0,01^*$	-
Сперматогонії:			
ядро	$7,4 \pm 0,09^*$	$9,0 \pm 0,07^*$	-
цитоплазма	$7,2 \pm 0,09^*$	$8,2 \pm 0,07^*$	-
Атипичні статеві клітини (TIN) (n=23):			
ядро	-	$6,4 \pm 0,12$	-
цитоплазма	-	$3,6 \pm 0,17$	-
Клітини Сертолі:			
ядро	$7,2 \pm 0,04^*$	$7,8 \pm 0,07^{***}$	$8,9 \pm 0,04^{***}$
цитоплазма	$5,7 \pm 0,09^*$	$6,8 \pm 0,07^{***}$	$8,4 \pm 0,06^{***}$
Клітини Лейдіга:			
ядро	$2,3 \pm 0,04^{***}$	$0,2 \pm 0,01^*$	$0,1 \pm 0,02^{**}$
цитоплазма	$5,7 \pm 0,07^*$	$6,9 \pm 0,16^{***}$	$7,8 \pm 0,18^{***}$

Примітки: \*, \*\* – вірогідно між групами;  $p \leq 0,001$ .

Необхідно відзначити, що у 33 (82,5%) випадках із блоком сперматогенезу різного рівня в інтерстиційній тканині яєчка виявляли масивні ділянки клітин Лейдіга з ознаками виразної гіперплазії та гіпертрофії – так звана «лейдигізація» інтерстицію (рис. 2).

Дослідження показало, що найхарактерніші передракові зміни тестикулярної тканини, які гістологічно виявляються в перитуморальній тканині яєчка, – це поява атипичних статевих клітин (TIN) у сім'яних каналцях (60% спостережень) і виразна «лейдигізація» інтерстицію (82,5% випадків), котрі виявляють на тлі блокування сперматогенезу у 95% пацієнтів (рис. 2). ІГХ-дослідження дало можливість встановити, що в сім'яних каналцях із блоком сперматогенезу відбувається значне посилення ядерної та цитоплазматичної експресії протеїну ubiquitin у вигляді вірогідного підвищення відповідних показників ІГХК у сперматогоніях, сперматоцитах і сперматидях, а також у клітинах Сертолі, порівнюючи з аналогічними показниками в каналцях зі збереженим сперматогенезом. Тобто в перитуморальній тестикулярній тканині у клітинах каналців із порушенням сперматогенезу відбувається посилення процесів убіквітинації, а це свідчить про інтенсивні процеси протеолізу великої кількості пошкоджених внутрішньоклітинних білків.

На тлі цих процесів у 60% спостережень у каналцях із блокованим сперматогенезом з'являються атипіві статеві клітини (TIN), які мають суттєві морфологічні відмінності від нормальних клітин сперматогенезу, а також відрізняються іншим характером експресії протеїну ubiquitin – переважно мають слабку цитоплазматичну та помірну ядерну експресію протеїну ubiquitin (ІГХК=3,60±0,17 і 6,40±0,12 відповідно), що вірогідно нижче відповідних показників ІГХК у сперматогоніях (табл. 1).

Як відомо, більшість (90–95%) новоутворень яєчка має будову герміногенної пухлини. Вважається, що TIN є попередником більшості ГПЯ за винятком сперматоцитарної семіноми в чоловіків похилого віку, пухлин жовткового мішка і зрілої тератоми в немовлят. Пусковий механізм патогенезу TIN і ГПЯ спільний – порушення регуляції програми поліпотентної зародкової герміногенної клітини. Деякі автори вважають TIN неінвазивним раком, оскільки анапластичні клітини розташовані в межах сім'яного каналця та виявляються у тканині яєчка, що оточує пухлину, у 90% випадків [4]. Маркерами TIN є M2A C-KIT, OCT4/NANOG, PLAP [12,13]. Обґрунтована теорія гістогенезу герміногенних пухлин яєчка, згідно з якою клітини TIN є плюрипотентними, з них може розвинути будь-який тип пухлини яєчка. Це також підтверджує гіпотезу, що розглядає TIN як преінвазивну стадію герміногенних пухлин [11]. Проте існує чимало досліджень, що вказують на зв'язок порушень сперматогенезу з розвитком ГПЯ [8,9]. На нашу думку, порушення цитодиференціації, котрі лежать в основі процесів блокування сперматогенезу, зумовлюють виникнення анапластичних змін у сперматогенному епітелії, що може призводити до утворення атипіві статевих клітин, які є початковим етапом канцерогенезу в яєчку.

У клітинах Лейдіга, що в перитуморальній тестикулярній тканині у 82,5% спостережень характеризуються виразною гіперплазією з ознаками «лейдигізації» інтерстицію, під час ІГХ-дослідження виявили вірогідне підвищення цитоплазматичної експресії та майже повне зникнення ядерної експресії протеїну ubiquitin у спостереженнях із блоком сперматогенезу, включаючи синдром «лише клітини Сертолі» в порівнянні з аналогічними показниками ІГХК у спостереженнях зі збереженим сперматогенезом. На нашу думку, в інтерстиційних

ендокриноцитах – клітинах Лейдіга, котрі здійснюють регулюючий вплив на процеси сперматогенезу, відбувається порушення процесів убіквітинації, що надалі призводить до порушень і блокування сперматогенезу. Це опосередковано підтверджується дослідженнями інших авторів, які показали: інактивація ubiquitin protein ligase, що локалізована в чоловічих статевих клітинах, призводить до блокування сперматогенезу та розвитку неплідності [5,10,14].

#### Висновки

1. Поява атипіві статевих клітин (TIN) у сім'яних каналцях із блоком сперматогенезу (визначили в 60% спостережень) і виразна «лейдигізація» інтерстицію (виявили в 82,5% випадків) – найбільш характерні морфологічні ознаки перитуморальної тканини яєчка, які можна охарактеризувати як передракові зміни тестикулярної тканини.

2. У результаті ІГХ-дослідження встановили, що в перитуморальній тестикулярній тканині в сім'яних каналцях із блоком сперматогенезу, які становлять 95% спостережень, у сперматогоніях, сперматоцитах і сперматидях, а також у клітинах Сертолі відбувається посилення процесів убіквітинації. Це свідчить про інтенсивні процеси протеолізу великої кількості пошкоджених внутрішньоклітинних білків у клітинах.

3. У 60% спостережень у каналцях із блокованим сперматогенезом з'являються атипіві статеві клітини (TIN), що відрізняються від нормальних клітин сперматогенезу характером експресії протеїну ubiquitin – мають вірогідно нижчі ІГХ-показники ядерної та цитоплазматичної експресії протеїну ubiquitin.

4. У спостереженнях із блоком сперматогенезу, включаючи синдром «лише клітини Сертолі», в інтерстиційних ендокриноцитах – клітинах Лейдіга, що здійснюють регулюючий вплив на процеси сперматогенезу, визначили порушення процесів убіквітинації, тобто посилення цитоплазматичної експресії та майже повне зникнення ядерної експресії протеїну ubiquitin.

5. Визначені особливості експресії протеїну ubiquitin у перитуморальній тканині яєчка хворих на ГПЯ можна охарактеризувати як передракові, що свідчать про важливу роль структурних і функціональних порушень компонентів убіквітин-протеолітичної системи на початкових етапах канцерогенезу в яєчку.

#### Список літератури

1. Рак в Україні, 2011–2012. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби // Бюлетень Національного канцер-реєстру України / Національний інститут раку. – К., 2013. – №14. – 120 с.
2. Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life / A. Ciechanover // EMBO J. – 1998. – Vol. 17. – №24. – P. 7151–7160.
3. Ciechanover A. The ubiquitin proteolytic system and pathogenesis of human diseases: a novel platform for mechanism-based drug targeting / A. Ciechanover // Biochem. Soc. Trans. – 2003. – Vol. 31. – №2. – P. 474–481.
4. Conservative management of small testicular tumors relative to carcinoma in situ prevalence / E. Huyghe, M. Soulie, G. Escourrou et al. // J. Urol. – 2005. – Vol. 173. – P. 820–823.
5. Developmental defects and male sterility in mice lacking the ubiquitin-like DNA repair gene mHR23B / J.M. Ng, H. Vrieling, K. Sugawara et al. // Mol. Cell. Biol. – 2002. – Vol. 22. – №4. – P. 1233–1245.
6. Expression of ABH blood group isoantigen as a prognostic factor in transitional cell bladder carcinoma / P.U. Malmström, C. Busch, B.J. Norben et al. // Scand. J. Urol. Nephrol. – 1998. – Vol. 22. – P. 265–270.
7. Histological typing of testis tumours, second edition / F.K. Mostofi, I.A. Sesterhenn, L.H. Sobin et al. – Berlin, 1998.
8. Incidental testicular tumors in infertile men / R. Tal, R. Holland, A. Belenky et al. // Fertil. Steril. – 2004. – Vol. 82. – P. 469–471.

9. Increased incidence of testicular cancer in men presenting with infertility and abnormal semen analysis / D. Raman Jay, F. Nobert Craig, M. Goldstein // *The Journal of Urology*. – 2005. – Vol. 174. – P. 1819–1822.
10. Mice lacking the UBC4-testis gene have a delay in postnatal testis development but normal spermatogenesis and fertility / N. Bedard, P. Hingamp, Z. Pang et al. // *Mol. Cell. Biol.* – 2005. – Vol. 25. – №15. – P. 6346–6354.
11. Prevalence of testicular intraepithelial neoplasia in healthy males / J. Linke, V. Loy, K.P. Dieckmann // *J. Urol.* – 2005. – Vol. 173. – P. 1577–1579.
12. Screening for intratubular neoplasia of the testis using OCT4 immunohistochemistry / T.D. Jonnes, G.T. MacLennan, J.M. Bonnin et al. // *Am. J. Surg. Pathology*. – 2006. – Vol. 30. – №11. – P. 1427–1431.
13. Stem cell factor as a novel diagnostic marker for early malignant germ cells / H. Stoop, F. Honnecker, G.J. Van de Geijn et al. // *J. Pathology*. – 2008. – Vol. 216. – №1. – P. 43–54.
14. Sutovsky P. Ubiquitin-dependent proteolysis in mammalian spermatogenesis, fertilization, and sperm quality control: killing three birds with one stone / P. Sutovsky // *Microsc. Res. Tech.* – 2003. – Vol. 61. – №1. – P. 88–102.
15. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction / M.H. Glickman, A. Ciechanover // *Physiol Rev.* – 2002. – №82. – P. 373–428.
5. Ng, J. M., Vrieling, H., Sugawara, K., Ooms, M. P., Grootegoed, J. A., Vreeburg, J. T., et al. (2002). Developmental defects and male sterility in mice lacking the ubiquitin-like DNA repair gene mHR23B. *Mol. Cell. Biol.*, 22(4), 1233–1245. doi: 10.1128/MCB.22.4.1233-1245.2002.
6. Malmstrum, P. U., Busch, C., Norben, B. J., & Andersson, B. (1998). Expression of ABH blood group isoantigen as a prognostic factor in transitional cell bladder carcinoma. *Scand. J. Urol. Nephrol.*, 22, 265–270.
7. Mostofi, F. K., Sesterhenn, I. A., & Sobin, L. H. (1998). *Histological typing of testis tumours*. Berlin.
8. Tal, R., Holland, R., Belenky, A., Konichezky, M., & Baniel, J. (2004). Incidental testicular tumors in infertile men. *Fertil. Steril.*, 82, 469–471. doi: 10.1016/j.fertnstert.2003.12.048.
9. Raman Jay, D., Nobert Craig, F., & Goldstein, M. (2005). Increased incidence of testicular cancer in men presenting with infertility and abnormal semen analysis. *The Journal of Urology*, 174, 1819–1822.
10. Bedard, N., Hingamp, P., Pang, Z., Karaplis, A., Morales, C., Trasler, J., et al. (2005). Mice lacking the UBC4-testis gene have a delay in postnatal testis development but normal spermatogenesis and fertility. *Mol. Cell. Biol.*, 25(15), 6346–6354. doi: 10.1128/MCB.25.15.6346-6354.2005.
11. Linke, J., Loy, V., & Dieckmann, K. P. (2005). Prevalence of testicular intraepithelial neoplasia in healthy males. *J. Urol.*, 173, 1577–1579. doi: 10.1097/01.ju.0000154348.68575.95.
12. Jonnes, T. D., MacLennan, G. T., Bonnin, J. M., Varsegi, M. F., Biair, J. E., Cheng, L. (2006). Screening for intratubular neoplasia of the testis using OCT4 immunohistochemistry. *Am. J. Surg. Pathology*, 30(11), 1427–1431. doi: 10.1097/01.pas.0000213288.50660.f7.
13. Stoop, H., Honecker, F., van de Geijn, G. J., Gillis, A. J., Cools, M. C., de Boer, M., et al. (2008). Stem cell factor as a novel diagnostic marker for early malignant germ cells. *J. Pathology*, 216(1), 43–54. doi: 10.1002/path.2378.
14. Sutovsky, P. (2003). Ubiquitin-dependent proteolysis in mammalian spermatogenesis, fertilization, and sperm quality control: killing three birds with one stone. *Microsc. Res. Tech.*, 61(1), 88–102. doi: 10.1002/jemt.10319.
15. Glickman, M. H., & Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.*, 82, 373–428. doi: 10.1152/physrev.00027.2001.

## References

1. (2013) Rak v Ukraini, 2011–2012. Zakhvoriuvanist, smertnist, pokaznyky diialnosti onkologichnoi sluzhby. [Cancer in Ukraine, 2011–2012. Disease, mortality, indicators of activity oncologic service]. *Biuletyn Natsionalnoho kantser-reiestru Ukrainy*, 14. [in Ukrainian].
2. Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J.*, 17(24), 7151–7160. doi: 10.1093/emboj/17.24.7151.
3. Ciechanover, A. (2003). The ubiquitin proteolytic system and pathogenesis of human diseases: a novel platform for mechanism-based drug targeting. *Biochem. Soc. Trans.*, 31(2), 474–481. doi: 10.1042/BST0310474.
4. Huyghe, E., Soulie, M., Escourrou, G., Miesusset, R., Plante, P., & Thonneau, P. (2005). Conservative management of small testicular tumors relative to carcinoma in situ prevalence. *J. Urol.*, 173, 820–823. doi: 10.1097/01.ju.0000152532.34475.4e.

## Відомості про авторів:

Базалицька С.В., к. біол. н., пров. науковий співробітник лабораторії патоморфології, ДУ «Інститут урології НАМН України»,  
E-mail: svetlana\_bazalic@inbox.ru.

Романенко А.М., д. мед. н., професор, академік НАМН України, зав. лабораторії патоморфології, ДУ «Інститут урології НАМН України».

## Сведения об авторах:

Базалицкая С.В., к. биол. н., вед. научный сотрудник лаборатории патоморфологии, ГУ «Институт урологии НАМН Украины»,  
E-mail: svetlana\_bazalic@inbox.ru.

Романенко А.М., д. мед. н., профессор, академик НАМН Украины, зав. лабораторией патоморфологии, ГУ «Институт урологии НАМН Украины».

## Information about author:

Bazalytska S.V., Ph.D., Leading Researcher of the Department of Pathomorphology, State Institution «Institute of Urology of National Academy of Medical Sciences of Ukraine, E-mail: svetlana\_bazalic@inbox.ru.

Romanenko A.M., M.D., PhD, DSci, Professor, Academician of National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Head of the Department of Pathomorphology, State Institution «Institute of Urology of National Academy of Medical Sciences of Ukraine.

Надійшла в редакцію 08.04.2015 р.

С. И. Тертышный, В. Е. Вотева

**Экспрессия Pan cytokeratin в менингиомах головного мозга**

Запорожский государственный медицинский университет

**Ключевые слова:** менингиома, гистогенез, цитокератин.

Менингиомы головного мозга – вторая по частоте диагностирования опухоль центральной нервной системы у взрослых, составляя до 30% всех первичных новообразований. С целью определения наличия и оценки уровня экспрессии цитокератина в доброкачественных и злокачественных менингиомах головного мозга в образцах ткани менингиом, удаленных во время нейрохирургических операций у 30 больных, проведено иммуногистохимическое исследование с использованием моноклональных антител Мо а-Hu Cytokeratine (PanCK), Clone AE1/AE3 («ДАКО», Дания). Установлено, что анапластические менингиомы экспрессировали цитокератин в 80% случаев. Среди доброкачественных менингиом положительная экспрессия обнаружена в 40% фибробластических вариантов. Это свидетельствует, что цитокератины необходимо включить в панель иммуногистохимических маркеров, используемых при дифференциальной диагностике различных вариантов менингиом.

**Експресія Pan cytokeratin у менингіомах головного мозку**

С. І. Тертишний, В. Є. Вотева

Менінгіоми головного мозку – друга за частотою діагностування пухлина центральної нервової системи, що становить до 30% усіх первинних новоутворень. З метою визначення наявності та оцінювання рівня експресії цитокератину в доброякісних і злоякісних менінгіомах головного мозку у зразках тканини менінгіом, котрі видалені під час нейрохірургічних операцій у 30 хворих, здійснили імуногістохімічне дослідження з використанням моноклональних антитіл Мо а-Hu Cytokeratine (PanCK), Clone AE1/AE3 («ДАКО», Данія). Встановили, що анапластичні менінгіоми експресували цитокератин у 80% випадків. Серед доброякісних менінгіом позитивну експресію виявили в 40% фібробластичних варіантів. Це свідчить, що цитокератини треба включити в панель імуногістохімічних маркерів, які використовують під час диференційної діагностики різних варіантів менінгіом.

**Ключові слова:** менінгіома, гистогенез, цитокератин.**Патологія.** – 2015. – №1 (33). – С. 31–34**Pan cytokeratin expression by meningiomas of the brain**

S. I. Tertishnyy, W. E. Voteva

Meningiomas of the brain are the second most common tumor of the CNS in adults, accounting about 30% of all primary tumors.

Aim. In order to determine the presence and to assess the expression level of cytokeratin (CK) in benign and malignant brain meningiomas tissue samples were obtained during neurosurgical operations from 30 patients.

Methods and results. Tissue samples were studied immunohistochemically by using monoclonal antibodies Mo a-Hu Cytokeratine (PanCK), Clone AE1/AE3 («ДАКО», Denmark). It was established that anaplastic meningiomas expressed CK in 80% of cases. Among benign meningiomas positive expression was found in 40% of fibroblastic subtypes.

**Key words:** Meningioma, Histogenesis, Cytokeratin.**Pathologia.** 2015; №1 (33): 31–34

Менингиомы головного мозга – вторая по частоте диагностирования опухоль центральной нервной системы (ЦНС) у взрослых, составляя до 30% всех первичных новообразований. Согласно последней классификации ВОЗ (2007), в зависимости от гистологического строения и агрессивности поведения менингиомы подразделяют на доброкачественные (grade I), атипические (grade II) и анапластические (grade III) [1]. Большинство этих опухолей представляют собой доброкачественные новообразования, четко отграниченные от окружающих мозговых структур без тенденции к инвазии и метастазированию. Анапластические менингиомы характеризуются высокой вероятностью рецидива, высокой пролиферативной активностью, наличием очагов некроза, увеличенным ядерно-цитоплазматическим отношением, расслаивающей схемой роста. Несмотря на наличие названных диагностических критериев, эти

опухоли бывает крайне трудно дифференцировать от других злокачественных новообразований, таких как меланомы, карциномы и саркомы [2,3].

Считается, что менингиомы происходят из вершечных арахноидальных клеток, которые формируют наружный слой паутинной оболочки. Однако возможность происхождения опухоли из более примитивных клеток-предшественников не исключается. До сих пор точно не установлен гистогенез клеток менингиом. Предполагается, что они обладают как мезенхимальным, так и эпителиальным потенциалом. Схожесть с мезенхимальными клетками подтверждается веретенообразной морфологией и способностью продуцировать коллагеновую строму. В пользу эпителиальной дифференцировки свидетельствует ультраструктурное подтверждение наличия множественных межклеточных контактов типа десмосом и полудесмосом, секреторная функция

и иммуногистохимическая экспрессия эпителиального мембранного антигена (ЭМА) [4]. ЭМА – основной диагностический маркер для менингиом, но его экспрессия может быть слабой в фибробластических, атипических и анапластических менингиомах.

Некоторым анапластическим менингиомам присущи эпителиоидные черты, при этом они ошибочно могут быть приняты за метастатические карциномы. Об эпителиальной дифференцировке также свидетельствует экспрессия цитокератинов (СК) [3], которая до сегодня остается недостаточно изученной. Некоторые из мезенхимальных опухолей также обладают способностью экспрессировать кератин [5]. Считается, что из внутримозговых опухолей СК экспрессируют папилломы хориоидного сплетения, некоторые менингиомы, а глиомы и низкодифференцированные нейроэктодермальные опухоли СК-негативны [3,6]. При этом данные относительно экспрессии цитокератинов в менингиомах головного мозга крайне немногочисленны, что определяет актуальность данного исследования.

### Цель работы

Установить наличие и провести оценку уровня экспрессии цитокератина в доброкачественных и злокачественных менингиомах головного мозга.

### Материалы и методы исследования

Проанализировали 10 случаев анапластических менингиом (grade III) и 20 случаев доброкачественных менингиом (grade I), удаленных при нейрохирургических операциях. Доброкачественные менингиомы включали 10 менинготелиоматозных вариантов, 5 фибробластических и 5 переходных. Градация по степеням злокачественности произведена согласно последней классификации опухолей ЦНС ВОЗ (2007). Срезы окрашивали по стандартной методике гематоксилином и эозином. Среди анапластических менингиом 80% имели супратенториальную локализацию, 20% – супра-субтенториальную; 90% доброкачественных менингиом имели супратенториальную локализацию на конвекситальной поверхности больших полушарий, 10% – субтенториальную. Возраст больных составлял от 55 до 70 лет.

Для иммуногистохимического (ИГХ) исследования на прецизионном ротационном микротоме HM 3600 («MICROM Laborgerate GmbH», ФРГ) изготавливали серийные срезы толщиной 4 мкм, которые помещали на адгезивные предметные стекла «SUPER FROST PLUS» («Menzel Glaser», ФРГ). Согласно стандартизированным протоколам в парафиновых срезах после температурной демаскировки антигенов путем нагревания на водяной бане в Трис-ЭДТА буфере (pH=9,0) и угнетения активности эндогенной пероксидазы 3% раствором перекиси водорода выполнили ИГХ-исследование с использованием моноклональных антител Мо а-Hu Cytokeratine (PanCK), Clone AE1/AE3 («ДАКО», Дания) и систем визуализации EnVision+ («ДАКО», Дания) с диаминобензидином. Уровень экспрессии оценивали по количественным методом по шкале от 0 до 4 баллов: отсутствие экспрессии – 0 баллов, слабая экспрессия в

5–10% клеток – 1 балл, умеренно выраженная экспрессия в 11–30% клеток – 2 балла, выраженная экспрессия в 31–60% клеток – 3 балла, выраженная экспрессия в 61–100% клеток – 4 балла.

### Результаты и их обсуждение

Среди доброкачественных менингиом выделяют 9 гистологических вариантов, которые характеризуются широкой вариабельностью строения. В нашем исследовании экспрессия СК в менинготелиоматозных вариантах не установлена, что совпадает с данными других авторов [7]. Опубликованы данные, указывающие, что менинготелиоматозные менингиомы экспрессируют СК, при этом фокальная экспрессия СК обнаружена вокруг гиалиновых телец. Она находилась в пропорциональной зависимости от количества гиалиновых телец, которые не окрашивались [8]. Так как количество исследованных случаев было крайне ограниченным, нельзя говорить о достоверности полученных результатов.

При исследовании опухоли и прилежащих участков мозговой паренхимы экспрессия СК отмечена только в мягких мозговых оболочках, для которых была характерна слабая диффузная иммунореактивность, уровень экспрессии составил  $1,05 \pm 0,05$  балла.

Известно, что переходные менингиомы характеризуются смешанными чертами строения, которые характерны как для менинготелиоматозных вариантов, так и для фибробластических. В переходных вариантах в 20% случаев обнаружена фокальная цитоплазматическая экспрессия СК. Уровень экспрессии составил  $1,50 \pm 0,08$  балла. Сходство с менинготелиоматозными менингиомами состояло в наличии эпителиодных клеток округлой или полигональной формы, расположенных в виде альвеолярных структур или образующих завихрения, при этом иммунореактивность установлена в клетках; образующих своеобразные завихрения, а также возле псаммомных телец.

В специализированной литературе не обнаружили данных об экспрессии СК в фибробластических вариантах менингиом grade I. Однако в 40% исследованных образцов мы установили цитоплазматическую экспрессию СК: для 20% фибробластических менингиом характерна слабая диффузная экспрессия, остальные 20% опухолей характеризовались диффузной умеренно выраженной иммунореактивностью, гранулы коричневатого цвета располагались в виде тяжей в цитоплазме клеток веретеновидной формы. В целом, уровень экспрессии составил  $2,10 \pm 0,12$  балла (рис. 1А). Среди всех исследованных фибробластических вариантов 60% случаев были иммунонегативны.

Считается, что экспрессия маркеров эпителиальной дифференцировки наиболее выражена в секреторных вариантах, для которых характерны выраженные признаки эпителиальной дифференцировки, такие как железистая метаплазия с микроворсинками, ресничками, внутрипросветная секреция и множественные межклеточные контакты [9]. Данные об экспрессии эпителиальных маркеров в других вариантах доброкачественных ме-



нингиом крайне немногочисленны. В клеточных линиях, полученных из культуры клеток доброкачественных менингиом с помощью метода иммунофлуоресценции, установлена экспрессия как мезенхимальных антигенов (виментина), так и эпителиальных (СК).

Анапластические менингиомы обладают выраженными инвазивными свойствами и способностью к раннему рецидивированию, что значительно ухудшает качество жизни больных. При этом агрессивное поведение этих опухолей зависит от комплексного взаимодействия различных механизмов, одним из которых является процесс эпителиально-мезенхимальной трансформации (ЭМТ). ЭМТ играет важную роль в процессах эмбриогенеза, тканевой дифференцировки и заживления ран, но также имеет место при различных патологических процессах, таких как фиброз или опухолевая прогрессия. В эпителиальных опухолях ЭМТ характеризуется разрушением межклеточных контактов, в частности десмосом и полудесмосом, с потерей экспрессии таких белков, как E-cadherin, нарушением апикально-базальной полярности, приобретением мезенхимальных свойств и полной реорганизацией промежуточных филаментов, в частности снижением экспрессии СК [10], что в комплексе способствует приобретению опухолевыми клетками подвижности и способности к метастазированию. Однако существует и обратный процесс – мезенхимально-эпителиальная трансформация (МЭТ), когда в метастазах опухоли происходит переключение от мезенхимального к эпителиальному фенотипу с восстановлением экспрессии эпителиальных маркеров, характерных для первичной опухоли.

Полученные результаты свидетельствуют, что анапластические менингиомы экспрессировали СК в 80% случаев, уровень иммунореактивности составил

3,90±0,35 балла. Для 70% из них характерна выраженная диффузная экспрессия в виде темно-коричневых гранул в цитоплазме 80–90% опухолевых клеток (рис. 1Б).

Диффузная умеренно выраженная иммунореактивность отмечена в 10% злокачественных менингиом, при этом в цитоплазме 70–80% клеток наблюдали экспрессию в виде гранул светло-коричневого цвета. Все положительно окрашенные образцы менингиом получены от больных с рецидивом опухоли.

Полученные данные согласуются с результатами исследований других авторов, но в специализированной литературе отсутствует точная информация, объясняющая положительную экспрессию СК в злокачественных менингиомах.

#### Выводы

1. Иммуноэкспрессия пан-цитокератина регистрируется в 20% переходных (фокальная цитоплазматическая экспрессия), 40% фибробластических (диффузная цитоплазматическая экспрессия) и 80% анапластических (диффузная цитоплазматическая экспрессия) менингиомах, что может свидетельствовать о переходе от мезенхимального к эпителиальному фенотипу.

2. Цитокератины необходимо включить в панель иммуногистохимических маркеров, используемых при дифференциальной диагностике различных вариантов доброкачественных менингиом, а также при дифференциальной диагностике анапластических и доброкачественных менингиом.

**Перспективы дальнейших исследований** в этом направлении предполагают изучение различных иммуногистохимических характеристик менингиом для более точного определения их гистогенеза и биологических свойств, что повысит качество дифференциальной диагностики и лечения данной патологии.

#### Список литературы

- World Health Organization Classification of Tumours of the Central Nervous System / D.N. Louis, H. Ohgaki, O.D. Wiestler et al. – Lyon : IARC, 2007. – P. 164–172.
- Molecular Targets and Treatment of Meningioma / Jr.R. Miller, M.L. DeCandio, Y. Dixon-Mah et al. // J. Neurol. Neurosurg. – 2014. – Vol. 1. – №1.
- Pekmezci M. Neuropathology of brain metastases / M. Pekmezci, A. Perry // Surgical Neurology International. – 2013. – Vol. 4. – S245–55.
- Бекяшев А.Х. Патогенез менингиом (обзор литературы) / А.Х. Бекяшев // Опухоли головы и шеи. – 2011. – №4. – С. 26–40.
- Abdelzaher E. Expression of mesothelioma-related markers in meningiomas: an immunohistochemical study / E. Abdelzaher, D.M. Abdallah // Biomed Res Int. – 2014. – 30 Apr.
- Бабиченко И.И. Новые методы иммуногистохимической диагностики опухолевого роста : учебное пособие / И.И. Бабиченко, В.А. Ковязин. – М. : РУДН, 2008. – 109 с.
- Expression of cytokeratin by malignant meningiomas: diagnostic pitfall of cytokeratin to separate malignant meningiomas from metastatic carcinoma / Y. Liu, C.D. Sturgis, M. Bunker et al. // Mod. Pathol. – 2004. – Vol. 17. – №9. – P. 1129–1133
- Epithelial membrane antigen and cytokeratin expression by meningiomas: an immunohistological study / J.M. Theaker, K.C. Gatter, M.M. Esiri et al. // J. Clin. Pathol. – 1986. – Vol. 39. – №4. – P. 435–439.
- Taraszevska A. Secretory meningiomas: immunohistochemical pattern of lectin and ultrastructure of pseudopsammoma bodies / A. Taraszevska, E. Matyja // Folia Neuropathol. – 2014. – Vol. 52. – №2. – P. 141–150.
- Chung B.M. Networking galore: Intermediate filaments and cell migration / B.M. Chung, J.D. Rotty, P.A. Coulombe // Curr. Opin. Cell. Biol. – 2013. – Vol. 25. – №5. – P. 600–612.

#### References

- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., & Cavenee, W. K. (Eds.). (2007). *World Health Organization Classification of Tumours of the Central Nervous System*. Lyon: IAR.
- Miller, R. Jr., DeCandio, M. L., Dixon-Mah, Y., Giglio, P., Vandergrift, W. A. 3<sup>rd</sup>, Banik, N. L., et al. (2014). Molecular Targets and Treatment of Meningioma. *Journal of Neurology and Neurosurgery*, 1(1).
- Pekmezci, M., & Perry, A. (2013). Neuropathology of brain metastases. *Surgical Neurology International*, 4, S245–55, doi: 10.4103/2152-7806.111302.
- Bekyashev, A. Kh. (2011). [Pathogenesis of meningiomas (a review of literature)]. *Opukholi holovy i shei*, 4, 26–40. [in Russian].
- Abdelzaher, E., & Abdallah, D. M. (2014). Expression of mesothelioma-related markers in meningiomas: an immunohistochemical study. *Biomed Research International*. doi: 10.1155/2014/968794.

6. Babichenko, I. I., & Kovyazin, V. A. (2008). *Novyie metody immunogistokhimicheskoy diagnostiki opukholevogo rosta [New methods of immunohistochemical diagnosis of tumor growth]*. Moscow: RUDN. [in Russian].
7. Liu, Y., Sturgis, C. D., Bunker, M., Saad, R. S., Tung, M., Raab, S. S., & Silverman, J. F. (2004). Expression of cytokeratin by malignant meningiomas: diagnostic pitfall of cytokeratin to separate malignant meningiomas from metastatic carcinoma. *Modern Pathology*, 17(9), 1129–1133. doi:10.1038/modpathol.3800162.
8. Theaker, J. M., Gatter, K. C., Esiri, M. M., & Fleming, K. A. (1986). Epithelial membrane antigen and cytokeratin expression by meningiomas: an immunohistological study. *Journal of clinical pathology*, 39(4), 435–439. doi: 10.1136/jcp.39.4.435.
9. Taraszewska, A., & Matyja, E. (2014). Secretory meningiomas: immunohistochemical pattern of lectin and ultrastructure of pseudopsammoma bodies. *Folia Neuropathologica*, 52(2), 141–150.
10. Chung, B. M., Rotty, J. D., & Coulombe, P. A. (2013). Networking galore: Intermediate filaments and cell migration. *Current opinion in cell biology*, 25(5), 600–612. doi: 10.1016/j.ceb.2013.06.008

**Сведения об авторах:**

Тертышный С.И., д. мед. н., профессор каф. патологической анатомии и судебной медицины, Запорожский государственный медицинский университет.

Вотева В.Е., заочный аспирант каф. патологической анатомии и судебной медицины, Запорожский государственный медицинский университет, E-mail: vanda.voteva@yandex.ru.

**Відомості про авторів:**

Тертишний С.І., д. мед. н., професор каф. патологічної анатомії та судової медицини, Запорізький державний медичний університет.

Вотева В.Є., заочний аспірант каф. патологічної анатомії та судової медицини, Запорізький державний медичний університет, E-mail: vanda.voteva@yandex.ru.

**Information about authors:**

Tertishnyy S.I., MD, PhD, Professor of the Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Zaporizhzhia State Medical University.

Voteva W.E., Postgraduate at the Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Zaporizhzhia State Medical University, vanda.voteva@yandex.ru.

Надійшла в редакцію 09.04.2015 р.

Ю. І. Кузик

**Фібром'язова дисплазія внутрішніх сонних артерій**

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

**Ключові слова:** фібром'язова дисплазія, сонної артерії хвороби, мікроскопія, клінічне дослідження.

Фібром'язова дисплазія – це захворювання артерій середнього та дрібного калібру із невідомою етіологією. З метою визначення особливостей патоморфологічної картини каротидної фібром'язової дисплазії вивчили операційний матеріал 134 хворих, яких прооперували з приводу симптомної фібром'язової дисплазії, застосовуючи методи світлової мікроскопії та гістохімічні методи. Встановили, що специфічною макроскопічною ознакою фібром'язової дисплазії сонних артерій є множинні мішкоподібні аневризми, що створюють картину «нитки намиста». Характерним патоморфологічним варіантом є медіальна фіброплазія із тотальною фіброзно-м'язовою трансформацією та повною втратою еластики. Це свідчить, що фібром'язова дисплазія є незапальним захворюванням, в основі якого – м'язова та сполучнотканнна трансформація, ймовірно, вродженого генезу.

**Фибромышечная дисплазия внутренних сонных артерий**

Ю. И. Кузык

Фибромышечная дисплазия – это заболевание артерий среднего и мелкого калибра с неизвестной этиологией. С целью определения особенностей патоморфологической картины каротидной фибромышечной дисплазии изучен операционный материал 134 больных прооперированных по поводу симптомной фибромышечной дисплазии с применением методов световой микроскопии и гистохимических методов. Установлено, что специфическим макроскопическим признаком фибромышечной дисплазии сонных артерий являются множественные мешковидные аневризмы, создающие картину, напоминающую «нитки бус». Характерный патоморфологический вариант фибромышечной дисплазии – медиальная фиброплазия с тотальной фиброзно-мышечной трансформацией и полной потерей эластичности. Это свидетельствует, что фибромышечная дисплазия является невоспалительным заболеванием, в основе которого лежит мышечная и соединительнотканная трансформация, вероятно, врожденного генеза.

**Ключевые слова:** фибромышечная дисплазия, сонной артерии болезни, микроскопия, клиническое исследование.**Патология.** – 2015. – №1 (33). – С. 35–38**Fibromuscular dysplasia of internal carotid artery**

Yu.I. Kuzyk

Fibromuscular dysplasia (FMD) is the disease of arteries of medium and small caliber with unknown etiology.

Aim. To determine the features of pathomorphological picture of carotid FMD operating material of 134 patients operated on for symptomatic FMD was studied using methods of light microscopy and histochemical methods.

Methods and results. It was established that specific macroscopic feature of FMD of carotid arteries are multiple saccular aneurysms, creating a picture of the «string of beads». A typical pathomorphological variant of FMD is medial fibroplasia with total fibro-muscular transformation and complete loss of elastic.

Conclusion. This indicates that FMD is a non-inflammatory disease, based on the muscular and connective tissue transformation, probably of congenital genesis.

**Key words:** Fibromuscular Dysplasia, Carotid Artery Disease, Microscopy, Clinical Trial.**Pathologia.** 2015; №1 (33): 35–38

Фібром'язова дисплазія (ФМД) – неатеросклеротичне та незапальне захворювання судин із переважним ураженням артерій середнього та дрібного калібру. Уперше це захворювання описали Leadbetter and Burkland (1938 р.) у 5-річного хлопчика з гіпертензією й атрофією правої нирки. Під час патоморфологічного дослідження ниркових артерій автори виявили стеноз судинного просвіту внаслідок «відкладення субінтимальних мас у гладком'язових клітинах» із витонченням артеріальної стінки [1,10]. Термін «фібромускулярна гіперплазія» впроваджений McCormack et al. (1958 р.). Дослідники за 20 років зібрали 4 випадки «фібромускулярної гіперплазії» і вперше докладно описали патологічні зміни [10]. Palubinskas and Ripley (1964 р.) вперше описали ФМД внутрішніх сонних артерій (ФМД ВСА). Connert and Lansche виконали першу операцію з приводу симптоматичної каротидної ФМД (1965 р.) [10].

Найчастіше ФМД уражає ниркові артерії (60–80%), рідше сонні та вертебральні артерії (25–30%), вісцеральні артерії (8–10%), артерії нижніх кінцівок (до 5%). Каротидну ФМД визначають у 0,5–3,0% пацієнтів із неврологічною симптоматикою під час церебральних ангіограм, із них лише у 0,02% – під час посмертного дослідження [3,4,6,7]. Цереброваскулярна ФМД уражає середню чи верхню частину внутрішніх сонних артерій у 95% пацієнтів, білатеральне ураження виявляють у 60–80%. Каротидна ФМД може поєднуватись з асимптотичними інтракраніальними аневризмами у 7% хворих; 51% пацієнтів із діагностованими симптоматичними інтракраніальними аневризмами мають каротину ФМД. Ураження вертебральних артерій при ФМД відзначають у 7–19% пацієнтів [5].

У всіх дослідженнях ФМД автори підкреслюють переважання жінок, що пов'язують з антипроліферативним

ефектом естрогенів на гладком'язові клітини (ГМК) судинної стінки. Вважають, що оральні контрацептиви та вагітність є чинниками ризику розвитку ФМД [1,4,5,8,9].

Патогістологічну класифікацію ФМД ниркових артерій запропонували Harrison and McCormack (1971), пізніше вона доповнена Stanley et al. (1975) [1,3]. Класифікація передбачає 4 типи залежно від ураження шарів судинної стінки: інтимальну фіброплазію, медіальну гіперплазію, медіальну фіброплазію, перимедіальну фіброплазію.

Здійснили ангіографічне обстеження 42 хворих на реноваскулярну гіпертензію, провели чітку кореляцію між патогістологічними й ангіографічними змінами (важливо для розуміння клініко-морфологічної прогресії захворювання) [10].

Пізніше усталену класифікацію доповнили, пропонуючи розрізняти 2 стадії ФМД ниркових артерій: фіброз медії з гіперплазією ГМК та ізольований тотальний фіброз, що відрізняються за прогнозом [5].

Патоморфологічне дослідження ВСА описане лише в окремих повідомленнях [8]. Оскільки цю патологію діагностують доволі рідко, то серії клініко-патоморфологічних досліджень каротидної ФМД у фаховій літературі відсутні. Зокрема, у ВСА деякі дослідники гістологічно визначили медіальну фібродисплазію [4,6], інші автори виявили також інтимальну фіброплазію [8]. Часте поєднання ФМД ВСА із патологічними звивистостями дало підставу вважати їх морфологічним проявом ФМД [2]. Отже, аналіз відомостей наукової літератури вказує на недостатнє вивчення патоморфологічних змін при каротидній ФМД.

#### Мета роботи

На основі комплексного патоморфологічного дослідження визначити характерні діагностичні критерії фібром'язової дисплазії внутрішніх сонних артерій.

#### Матеріали і методи дослідження

Дослідили операційний матеріал 134 хворих, яких прооперували з приводу симптомної каротидної ФМД у відділенні судинної хірургії Львівської обласної клінічної лікарні протягом 2001–2013 рр. Діагноз ФМД встановлювали під час дуплексного ультразвукового

сканування сонних артерій (ультрасонографічний апарат «Ultramark-9» фірми ATL). Ангіографічне дослідження здійснювали тільки в сумнівних випадках (6 хворих).

Основний метод оперативного втручання – резекція з редресацією та реімплантацією ВСА. За наявності атеросклеротичного ураження виконували каротидну ендатеректомію.

Серед 600 прооперованих з приводу каротидного стенозу ФМД виявили у 134 (22,3%) хворих. Визначили поєднання ФМД ВСА з іншими захворюваннями: патологічними звивистостями та атеросклерозом (49,3%), патологічними звивистостями (29,8%), атеросклерозом (8,2%). ФМД без поєднаної патології діагностували в 17 (12,6%) хворих.

Серед обстежених – 89 (66,4%) жінок, 44 (33,6%) чоловіків. Вік хворих – від 18 до 73 років. За віком у групі хворих переважали жінки 41–60 років.

Здійснили патоморфологічне дослідження всіх випадків операційного матеріалу. Резековані фрагменти сонних артерій (СА) фіксували в розчині формаліну, розрізали на кілька блоків, заливали в парафін. Зрізи завтовшки 5–8 мкм фарбували гематоксиліном та еозинном, фукселіном за Вейгертом, резорцин-фуксином за Хартом, комбінованою методикою за Вейгертом і ван Гізоном і трихромним Массоном. Варіанти ФМД ВСА діагностували, використовуючи патоморфологічні варіанти згідно з класифікацією Harrison and McCormack (1971) та Stanley et al. (1975) із власними доповненнями (табл. 1).

Результати статистично опрацювали, застосовуючи пакет статистичних програм «STATISTICA for Windows», версія 7,0.

#### Результати та їх обговорення

При ФМД ВСА виявили білатеральне ураження, тільки в 7 випадках була уражена одна судина. ФМД загальних СА виявили в 11 випадках. У 8 хворих унаслідок ФМД розвивались аневризми ВСА. Визначили множинну ФМД: у 3 випадках – сонних і хребцевої артерій, у 7 – внутрішніх сонних і ниркових артерій.

Протягом макроскопічного дослідження у 106 випадках виявили поєднання ФМД із патологічними

Таблиця 1

**Фібром'язова дисплазія: патоморфологічні й ангіографічні особливості (Harrison and McCormack, 1971; Stanley et al., 1975; Goncharenko et al., 1981; цит. за [1,3])**

Варіанти дисплазії	Частота, %	Патоморфологічні зміни	Ангіографічні зміни
Інтимальна фіброплазія	5–10	Субендотеліальні колагенові відкладення в інтимі з розривами внутрішньої еластичної мембрани	Поширений тубулярний стеноз, переважно двобічний
Медіальна гіперплазія	1–2	Ізольована гіперплазія ГМК без запалення чи фіброзу, незмінена інтима та адвентиція	Концентричний стеноз
Медіальна фіброплазія	80–90	Поля альтерації у витонченій медії, масивні фіброзно-м'язові розростання у верхній частині медії. Внутрішня еластична мембрана із множинними розривами. Інтима та адвентиція без змін	Артерія у вигляді «нитки намиста» з аневризматичною дилатацією та стенозом судинних просвітів. Двобічне ураження – 55%
Перимедіальна фіброплазія	10–15	Гіпереластоз і гіперхромія еластичних волокон на межі медії з адвентицією. Незмінена інтима	Множинний виражений стеноз артерій без дилатації
Адвентиційна (периартеріальна) фіброплазія	До 1	Вогнищеві розростання сполучної тканини в адвентиції та навколишніх шарах	Даних немає

звивистостями: S-подібні – 60 (56,6%), коулінг – 31 (29,2%), кінкінг – 15 (14,2%). У 17 випадках виявили поєднання S-подібних звивистостей із петлеутворенням. Таке поєднання ФМД і патологічних звивистостей може свідчити про спільність розвитку патологічного процесу при обох захворюваннях. Імовірно, обидва захворювання є вродженою патологією та можуть проявлятися навіть у дитячому віці [7].

У третині випадків виявили ознаки атеросклеротичного ураження – нестенозуючі бляшки. У 25 спостереженнях операційного матеріалу виявили множинні дрібні мішкоподібні анеризми, що створюють картину «нитки намиста». При розрізі інтима виточена та гладка, місцями визначаються потовщені складки, що випинають (рис. 1, 2).

Під час патоморфологічного дослідження в 4 випадках виявили інтимальну фіброплазію. Інтима – з ознаками циркулярної гіперплазії нерівномірного характеру, товщина інтими досягала товщини медії. У гіперплазованій інтимі та субінтимальному шарі визначили нерівномірні скупчення ГМК і сполучнотканинну проліферацію. ГМК дистрофічно змінені з вогнищевою вакуолізацією та перичелюлярним набряком (рис. 3). В інтимі та субінтимальному шарі визначили дифузну проліферацію колагенових волокон із формуванням подушкоподібних утворень, ГМК – з ознаками вакуольної дистрофії та вогнищами мукоїдизації; еластичні волокна дистрофічно змінені із формуванням вогнищевих павукоподібних утворень, які складаються із різко гіпохромних, витончених і мультиплікованих волокон. Виявили множинні щілоподібні пустоти, дрібні вогнища еластолізу, що чергуються з гіперхромними та гіперплазованими еластичними волокнами. Внутрішня еластична мембрана місцями звивиста, звичайної будови. Медія та адвентиція не змінені. В 1 випадку спостерігали розшарування ВСА. Змінена інтима була відшарована на значній довжині та частково перекривала судинний просвіт.

У решті випадків виявили ознаки медіальної фіброплазії. Стінка артерії мала нерівномірну товщину, формувались гребені, які випинались у судинний просвіт. У 10 випадках спостерігали утворення мікроаневризм, у котрих медія витончена, мала хаотичне розташування м'язових і сполучнотканинних волокон, еластика відсутня (рис. 4). Інтима звичайної будови. Внутрішня еластична мембрана – із множинними розривами та вогнищами еластолізу, а у третині випадків відсутня. У всіх випадках медія замінена розростанням компактної фібротизованої тканини. Фіброзно-м'язова трансформація була циркулярною за типом кільця та в основному займала всю товщу медії. Лише в 5 випадках фіброз був нерівномірний: у верхній третині медії виявили компактно сполучну тканину, в нижній третині – дистрофічно змінені колагенові волокна зі скупченнями розщеплених, дезорганізованих ГМК (рис. 5). Еластичний каркас медії повністю зруйнований розростаннями м'язових і сполучнотканинних волокон (рис. 6). У міоцитах виявили значну вакуолізацію цитоплазми, ядра клітин розташову-

валися периферично або їх взагалі не визначили. У 7 випадках спостерігали кістоподібні невеликі порожнини, частково заповнені вмістом, місцями вони формували по кілька злитих кістоподібних порожнин або мали вигляд пустот. Еластичні волокна були збережені лише вогнищево – скупчення гіперхромних грубих волокон з ознаками мультиплікації, гіпереластозу, множинними фрагментаціями і грудкуванням. Інший вид змін еластичних волокон являв собою формування кашкоподібних мас тонких гіпохромних множинно фрагментованих волоконцець. Адвентиція та периадвентиційні шари були не змінені. Інших форм ураження не спостерігали.

Результати нашого дослідження підтверджують відомості про частіше виникнення ФМД у жінок, а також переважне білатеральне ураження ВСА. Патоморфологічна форма ФМД у більшості випадків визначається чітко. Наші спостереження свідчать про єдину сутність процесу, а не про групу споріднених змін. При ФМД можливе ураження всіх шарів судинної стінки, але основні зміни локалізуються в медії. Як уже відзначали, ФМД ВСА має певні особливості: при медіальній фіброплазії переважає тотальний фіброз медії з повною втратою еластичних волокон. Переважне ураження еластики дає можливість вважати, що саме зміни еластичного каркаса є первинними, а проліферація м'язової та сполучної тканини є компенсаторним механізмом. Водночас дослідники стверджують, що багато пошкоджуваних чинників є причиною активної проліферації ГМК із гіперпродукцією м'язових і сполучнотканинних волокон. Це підтверджується нашими даними, що свідчать про дистрофічні зміни ГМК та активне фібротизування [3,5,10]. Деякі дослідники при ФМД ниркових артерій описують зміни *vasa vasorum*. Відомо, що ішемічні пошкодження ініціюють розвиток диспластичних процесів. Оскільки трофіка медії й адвентиції здійснюється *vasa vasorum*, а основні диспластичні зміни при ФМД спостерігають перимедіально та в медії, можна із великою ймовірністю вважати ішемію однією із провідних причин ФМД [6]. У наших спостереженнях не спостерігали склеротичні процеси *vasa vasorum*, іноді виявляли помірний периваскулярний фіброз.

Диференційну діагностику ФМД ВСА необхідно здійснювати з васкулітами, зокрема вузликосим периадвентиційним і хворобою Такаюсу [6,9]. Відсутність запальних і грубої склеротичної трансформації, а також наявність специфічних морфологічних проявів дає змогу діагностувати ФМД.

#### Висновки

ФМД ВСА – незапальне, неатеросклеротичне захворювання сонних артерій, що переважно виникає у жінок молодого та середнього віку.

Характерним є поєднання ФМД ВСА із різними типами патологічних звивистостей, а це свідчить про спільність їхнього розвитку.

Для ФМД типовим є білатеральне ураження, можливе поєднання ФМД ВСА із ФМД інших локалізацій.

Специфічна макроскопічна ознака ФМД ВСА – множинні мішкоподібні аневризми, що створюють картину «нитки намиста».

Характерним патоморфологічним варіантом при ФМД є медіальна фіброплазія з особливою тотальною фіброзно-м'язовою трансформацією медії та повною втрагою еластики.

Типові ускладнення ФМД ВСА – утворення аневризм,

розшарування судинної стінки, стеноз.

Диференційну діагностику ФМД слід проводити з васкулітами.

**Перспективи подальших досліджень** полягають у вивченні випадків поєднання ФМД ВСА та патологічних звивистостей із визначенням патоморфологічних змін, що дасть можливість відкрити нові механізми розвитку цих патологій.

### Список літератури

1. Кузык Ю.И. Фибромышечная дисплазия артерий / Ю.И. Кузык // Архив патологии – 2006. – Т. 68. – №4. – С. 57–61.
2. Anomalies of the extracranial internal carotid artery: anatomic and histologic study / G. La Barbera, G. La Marca, F. Cappello et al. // *International Angiology*. – 2006. – Vol. 25. – №2. – P. 145.
3. Begelman S.M. Fibromuscular dysplasia / S.M. Begelman, J.W. Olin // *Curr Opin Rheumatol*. – 2000. – Vol. 12. – P. 41–47.
4. Carotid artery fibromuscular dysplasia / K. Stahfeld, J. Maens, P. Didomenico // *Am. J. Surg.* – 2007. – Vol. 193. – №1. – P. 71–72.
5. Fibromuscular dysplasia of the carotid artery / W. Zhou, R.L. Bush, P. Lin et al. // *J Am Coll Surg*. – 2005. – Vol. 200. – P. 807.
6. Fibromuscular dysplasia of the internal carotid artery: personal experience with 13 cases and literature review / H. Van Damme, N. Sakalihan, R. Limet et al. // *Acta Chir Belg.* – 1999. – Vol. 99. – P. 163–168.
7. Fibromuscular dysplasia and childhood stroke / A. Kirton, M. Crone, S. Benseler et al. // *Brain*. – 2013. – Vol. 136. – P. 1846–1856.
8. Intimal fibromuscular dysplasia of the carotid artery: case report and review / Ju. Nader-Kawachi, E. Anaya-Santacruz, C. Penaherrera-Oviedo et al. // *Int. J. Stroke Res.* – 2014. – Vol. 2. – №1. – P. 1–5.
9. Olin J.W. Recognizing and managing fibromuscular dysplasia / J.W. Olin // *Cleve. Clin. J. Med.* – 2007. – Vol. 74. – P. 273–82.
10. Slovt D.P. Fibromuscular dysplasia / D.P. Slovt, J.F. Olin // *N Engl J Med*. – 2004. – Vol. 350. – P. 1862–1871.
1. La Barbera, G., La Marca, G., Cappello, F., & Valentino, F. (2006) Anomalies of the extracranial internal carotid artery: anatomic-clinical and histologic study. *International Angiology*, 25(2), 145.
2. Begelman, S. M., & Olin, J. W. (2000) Fibromuscular dysplasia. *Current Opin Rheumatology*, 12, 41–47.
3. Stahfeld, K., Maens, J., & Didomenico, P. (2007) Carotid artery fibromuscular dysplasia. *American Journal of Surgery*, 193(1), 71–72.
4. Zhou, W., Bush, R. L., Lin, P. I., Lumsted, A. B., & Kougiass S. (2005) Fibromuscular dysplasia of the carotid artery. *Journal American College of Surgery*, 200, 807.
5. Van Damme, H., Sakalihan, N., & Limet, R. (1999) Fibromuscular dysplasia of the internal carotid artery: personal experience with 13 cases and literature review. *Acta Chirurgia Belgium*, 99, 163–168.
6. Kirton, A., Crone, M., Benseler, S., Mineyko, A., Armstrong, D., Wade, A., et al. (2013) Fibromuscular dysplasia and childhood stroke. *Brain*, 136, 1846–1856. doi: 10.1093/brain/awt111.
7. Nader-Kawachi, Ju., Anaya-Santacruz, E., Penaherrera-Oviedo, C., Andrade-Magdaleno, M., Alva, L. F., & Chable-Montero, F. C. (2014) Intimal fibromuscular dysplasia of the carotid artery: case report and review. *International Journal of Stroke Research*, 2(1), 1–5. doi:10.5923/j.stroke.20140201.01.
8. Olin, J. W. (2007) Recognizing and managing fibromuscular dysplasia. *Cleveland Clinical Journal of Medicine*, 74, 273–82.
9. Slovt, D. P., & Olin, J. F. (2004) Fibromuscular dysplasia. *New England Journal of Medicine*, 350, 1862–1871.

### References

1. Кузык, Ю. И. (2006) Фибромышечная дисплазия артерий [Arterial fibromuscular dysplasia]. *Архив патологии*, 4(68), 57–61. [in Russian].

### Відомості про автора:

Кузык Ю.І., к. мед. н., доцент каф. патологічної анатомії та судової медицини, Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, E-mail: juliakuzyk@mail.ru.

### Сведения об авторе:

Кузык Ю.И., к. мед. н., доцент каф. патологической анатомии и судебной медицины, Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого, E-mail: juliakuzyk@mail.ru.

### Information about author:

Kuzyk Yu.I., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Danylo Halytsky Lviv National Medical University, E-mail: juliakuzyk@mail.ru.

Надійшла в редакцію 23.03.2015 р.

D. A. Putilin, A. M. Kamyshnyi

## Distribution of FoxP3<sup>+</sup> regulatory T-cells in rat's pancreatic lymph nodes under streptozotocin-induced diabetes and metformin administration

Zaporizhzhia State Medical University

**Key words:** *Diabetes mellitus, FoxP3, Metformin, Treg.*

Type 1 diabetes mellitus is a T-cell mediated autoimmune disease characterized by the destruction of  $\beta$ -cells of the pancreas. Numerous studies have demonstrated the key role of FoxP3<sup>+</sup> regulatory T-cells in the development of type 1 diabetes.

The aim of our study: 1) to determine the expression patterns of transcription factor FoxP3 in the pancreatic lymph node cells in animal model of diabetes mellitus and 2) to assay an effect of metformin on these processes.

Methods and results. The study was conducted on 60 male Wistar rats with streptozotocin-induced modeling diabetes with various duration of the diabetes. Within development of type 1 diabetes mellitus the number of Treg pancreatic lymph nodes has been reduced.

Conclusion. These findings demonstrate the ability of metformin to increase the number of Treg.

### Розподіл FoxP3<sup>+</sup> регуляторних Т-клітин у панкреатичних лімфатичних вузлах у щурів при стрептозототин-індукованому діабеті та при корекції метформіном

Д. А. Путілін, О. М. Камішній

Цукровий діабет 1 типу є Т-клітинно-опосередкованим аутоімунним захворюванням, що характеризується руйнуванням  $\beta$ -клітин підшлункової залози. Численні дослідження показали ключову роль FoxP3<sup>+</sup> регуляторних Т-клітин у розвитку цукрового діабету 1 типу. З метою визначення особливостей експресії транскрипційного фактора FoxP3 у клітинах панкреатичних лімфатичних вузлів при експериментальному цукровому діабеті та після введення метформіну здійснили дослідження на 60 самцях щурів лінії Вістар, у яких моделювали стрептозототин-індукований цукровий діабет із різною тривалістю патологічного процесу, а також після введення метформіну. Визначено, що при розвитку цукрового діабету 1 типу кількість Трег у панкреатичних лімфатичних вузлах знижується, а метформін демонструє здатність збільшувати щільність їхньої популяції.

**Ключові слова:** *цукровий діабет, FoxP3, метформін, Treg.*

**Патологія.** – 2015. – №1 (33). – С. 39–43

### Распределение FoxP3<sup>+</sup> регуляторных Т-клеток в панкреатических лимфатических узлах у крыс при стрептозототин-индуцированном диабете и при коррекции метформинном

Д. А. Путилин, А. М. Камышный

Сахарный диабет 1 типа – Т-клеточно-опосредованное аутоиммунное заболевание, характеризующееся разрушением  $\beta$ -клеток поджелудочной железы. Многочисленные исследования показали ключевую роль FoxP3<sup>+</sup> регуляторных Т-клеток в развитии сахарного диабета 1 типа. С целью определить особенности экспрессии транскрипционного фактора Foxp3 в клетках панкреатических лимфатических узлов при экспериментальном сахарном диабете и после введения метформина провели исследования на 60 самцах крыс линии Вистар, у которых моделировали стрептозототин-индуцированный сахарный диабет с разной продолжительностью патологического процесса, а также после введения метформина. Установлено, что при развитии сахарного диабета 1 типа количество Трег в панкреатических лимфатических узлах снижается, а метформин демонстрирует способность увеличивать плотность их популяции.

**Ключевые слова:** *сахарный диабет, FoxP3, метформин, Treg.*

**Патология.** – 2015. – №1 (33). – С. 39–43

Type 1 diabetes mellitus (T1DM) is a T-cell mediated autoimmune disease characterized by the destruction of pancreatic  $\beta$ -cells. Numerous studies have demonstrated the key role of FoxP3<sup>+</sup> regulatory T-cells (Tregs) in the development of T1DM [16]. Most studies of the role of Tregs in T1DM were performed on peripheral blood rather than pancreas or pancreatic lymph nodes. The autoimmune cascade that culminates in diabetes initiates within pancreatic lymph nodes (PLNs). At present all indications are that the PLN are essential in the initial activation of diabetogenic T-cells, prior to their islet migration [2]. The importance of the PLN in the development of diabetes was shown among two experimental settings. In the first setting, surgical excision from NOD mice resulted in the absence of diabetes without apparent priming of T cells [5]. In the second setting, offspring of pregnant

NOD mothers injected with lymphotoxin- $\beta$  receptor fused to human Ig Fc lacked lymph nodes and did not develop diabetes [10]. The level of autoreactivity was limited in these mice lacking PLN. In both situations, transfer of activated diabetogenic T-cells resulted in diabetes.

The mammalian target of rapamycin (mTOR) is now appreciated to be a central regulator of immune responses. Emerging evidence suggests that mTOR activity regulates development of CD4 T cell subsets, that include helper subsets (Th1, Th2, Th17, and follicular helper T or Tfh) and Treg [15]. Powell and colleagues have shown that differentiation T-cells into Th1, Th2, and Th17 is inhibited by CD4 T cells with a conditional deletion of mTOR [9]. Sufficient mTOR activity induces effector CD4<sup>+</sup> T helper subsets. A complete or strong block of the signaling mTOR pathway

prevents the generation of these effector cells, instead promotes Treg differentiation [1]. Metformin as an anti-diabetes drug might have double-edged sword effects (1) by acting on the organism to decrease hyperglycaemia and hyperinsulinemia in diabetic patients and (2) at the cellular level, by inhibiting the mTOR-supporting pathway through AMP-Activated Protein Kinase-dependent (AMPK) and independent mechanisms [13].

#### The aim of our study:

1) to determine the expression patterns of transcription factor FoxP3 in the pancreatic lymph node cells in animal model of diabetes mellitus and 2) to assay an effect of metformin on these processes.

#### Materials and methods

**Animals and tissue isolation.** Sixty six-month-old male Wistar rats were purchased from Veterinary Medicine Association Ltd. «Biomodelservis» (Kiev) and they were kept a 12-h light/dark cycle with controlled humidity (60–80%) and temperature ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ). All experiments on animals were performed according to international principles of «The European Convention for the Protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes» (Strasbourg, 1986) and «General ethical principles of animal research» (Ukraine, 2001). Test animals were divided into 5 experimental groups: control group, which were administered once intraperitoneally (i.p.) with 0.5 ml of 0.1 M citrate buffer (pH = 4.5) (group 1); rats with 21-day and 35-day STZ-induced diabetes mellitus (SIDM) (group 2 and 3); rats with 21-day and 35-day SIDM (group 4 and 5), which were respectively treated with metformin during 3 and 5 weeks at a dose of 50 mg/kg from 1-st day of diabetes induction.

**Induction of experimental diabetes.** Streptozotocin (STZ) (SIGMA Chemical, USA) was injected intraperitoneally at a dose of 50 mg/kg dissolved in 0.5 ml of 0.1 M citrate buffer (pH 4.5). Blood samples were collected from the tail vein. Determination of glucose concentration in peripheral blood was performed by the glucose-oxidase method using the instrument «BIONIME Rightest TM GM 110» (Switzerland) in 12 hours on the 3<sup>rd</sup>, 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, 21<sup>st</sup> and 35<sup>th</sup> days after injection of STZ. Measurement of blood glucose levels was performed after 6 hours from the last meal on the 3<sup>rd</sup> day after injection of STZ. For further studies animals with fasting glucose level > 8.0 mmol/l were selected.

**Immunohistochemical staining.** Population structure of FoxP3<sup>+</sup>-cells was studied on the basis of analysis of serial histological sections and their data of morphometric and densitometric characteristics. For this study a rotary microtome MICROM HR-360 (Microm, Germany) did 5 micron serial sections of PLN. They were deparaffinized in xylene, rehydrated in a descending carried concentrations of ethanol (100%, 96%, 70%), washed-up in 0.1 M phosphate buffer (pH = 7.4) and stained with a rabbit polyclonal primary antibodies (PABs) to the transcription factor FoxP3 (Santa Cruz Biotechnology, USA) for 18 hours in a humid chamber at  $t = 4^\circ\text{C}$ . After washing of the excess primary antibody in a 0.1 M phosphate buffer, sections were incubated for 60 minutes ( $t = 37^\circ\text{C}$ ) with a secondary antibody molecule

to the total rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, USA), conjugated with FITC. After incubation, sections were washed with 0.1 M phosphate buffer and embedded in a mixture of glycerol and a phosphate buffer (9:1) for the subsequent fluorescence microscopy. Treated histological sections were studied using computer software Image J (NIH, USA). Images which were obtained on the microscope PrimoStar (ZEISS, Germany) in the ultraviolet spectrum of excitation 390 nm (FITC) with using a highly sensitive camera AxioCam 5c (ZEISS, Germany) and the software package for receiving, archiving, and preparing images for publication AxioVision 4.7.2 (ZEISS, Germany) were immediately entered into the computer. In the automatic mode, areas with the statistically significant fluorescence characteristics of cells that express FoxP3 were identified. Morphometric and densitometric characteristics of immunopositive cells were determined. When painting the PABs FoxP3<sup>+</sup>-cells in the paracortical zone and medullary cords of PLN was examined.

**Statistical analysis.** All the experimental data were processed using statistical package of EXCEL (Microsoft Corp., USA), STATISTICA 6.0 (Stat-Soft, 2001). All variables were presented as the mean value (m) and the standard error of the mean (SEM). To identify the significance of differences in the results of studies of experimental and control groups of animals Student's coefficient (t) was determined, after which the sample was determined by the possibility of difference (p) and the average confidence interval. Critical significance level when testing statistical hypotheses assumed was equal to 0.05.

#### Results and discussion

Development of experimental streptozotocin-induced diabetes mellitus (3-week ESIDM) led to a change in representation of FoxP3<sup>+</sup>-lymphocytes in paracortical zone and medullary cords of pancreatic lymph nodes (PLN), in which the total density decreased by 25% ( $p < 0.05$ ) and 28% ( $p < 0.05$ ) as compared to control group (fig. 1A). Indicators in the group of rats with 5-week ESIDM decreased by 50% ( $p < 0.05$ ) only in medullary cords of PLN. The distribution into individual classes of FoxP3<sup>+</sup> lymphocytes in the PLN in the group of experimental animals with a 3-week ESIDM showed an increase in medullary cords of PLN percentage of FoxP3<sup>+</sup>-lymphoblasts by 40% ( $p < 0.05$ ), FoxP3<sup>+</sup>-medium lymphocytes by 42% ( $p < 0.05$ ), respectively, the percentage of FoxP3<sup>+</sup>-small lymphocytes decreased by 21% ( $p < 0.05$ ), and their population density by 42% ( $p < 0.05$ ), respectively.

After the administration of metformin in rats with 3-week ESIDM total density of FoxP3<sup>+</sup>-lymphocytes increased by 96% ( $p < 0.05$ ) in the paracortical area and by 93% ( $p < 0.05$ ) in medullary cords of PLN rats with respect to 3-week ESIDM (fig. 1B). The distribution into individual classes of FoxP3<sup>+</sup>-cells in the paracortical zone in the group of animals with 3-week ESIDM: the population density of FoxP3<sup>+</sup>-lymphoblast increased by 83% ( $p < 0.05$ ), the average FoxP3<sup>+</sup>-medium lymphocytes increased by 100% ( $p < 0.05$ ), FoxP3<sup>+</sup>-small lymphocytes increased by 2,2-fold ( $p < 0.05$ ). In medullary cords of PLN a change in the form of increasing the number of FoxP3<sup>+</sup>-lymphoblasts by 46% ( $p < 0.05$ ), and small lymphocytes by 2,7-fold ( $p < 0.05$ ) has taken place, too.



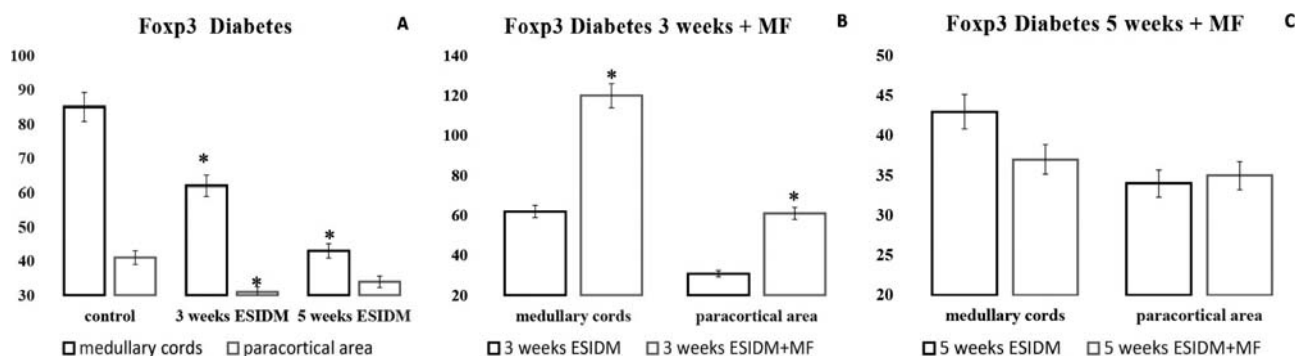


Fig. 1. The number (on 1 mm<sup>2</sup>) of FoxP3<sup>+</sup> cells in paracortical area and in medullary cords of PLN. The development of experimental STZ-induced diabetes (ESIDM)(A). The administration of Metformin (MF) (B, C) to experimental animals. Note: \* – P < 0.05.

The fluorescence intensity of FoxP3<sup>+</sup>-cells appeared to be significantly increased in medullary cords of PLN as at 3-week ESIDM and at 5-week ESIDM, namely FoxP3<sup>+</sup>-medium and small lymphocytes. At 5-week ESIDM FoxP3<sup>+</sup>-lymphoblasts concentration of transcription factor FoxP3 by 10% (p < 0.05) increased (fig.2 A-C). Administration of metformin resulted in a decrease in medullary cords of PLN concentration FoxP3 in FoxP3<sup>+</sup>-medium and small lymphocytes by 4%-13% (p < 0.05) with respect to indicators of a group of animals with a 3-week ESIDM that did not take metformin. A FoxP3 concentration in FoxP3<sup>+</sup>-lymphoblasts, on the contrary, increased by 9% (p < 0.05). In experimental animals with a 5-week ESIDM concentration of transcription factor FoxP3 in FoxP3<sup>+</sup>-small lymphocytes was significantly increased in the paracortical area of PLN (fig.2 A-C).

The obtained results coincide with the results of other investigators. PLN-derived Treg functions were impaired in T1DM subjects. Functional defects in T-regulatory cells are key features of the pancreatic lymph nodes in patients with type 1 diabetes [4]. Willcox et al. (2009) analyzed postmortem pancreatic samples from 29 T1DM patients. FoxP3<sup>+</sup> Tregs were only found in islets from a single patient, suggesting that the lack of Treg cells may play a pivotal role in autoimmunity among T1DM patients [18].

Compared to the results of studies in human subjects, several animal studies have focused on Tregs in the pancreas and PLNs. Tonkin et al. (2009) generated TGF-β-induced islet-specific Tregs and demonstrated their ability to suppress the transfer of diabetes into NOD scid mice using diabetic

spleen cells [17]. Infiltration of both Tregs and Teffs were observed in the pancreas, suggesting the active role that Tregs play in the inflammatory site. By the induction of hemopoietic chimerism, antea-diabetic mice were restored to adequate pancreatic islet function even after they had been rendered hyperglycemic. Compared to the antea-diabetic mice, the numbers of Tregs in the PLNs were significantly decreased in NOD mice, indicating that Tregs in the PLNs had a potential role in ameliorating disease progression in the model [14]. This observation supports conclusions that: (1) the lack of the Treg cells in the PLNs of the NOD mice may play a role in diabetogenesis; and (2) that improved Treg cell accumulation in the PLNs reflects recovery of the peripheral tissue tolerance in the PLNs of the antea-diabetic NOD mice and is part of the mechanisms leading to the resumption of euglycemia in these animals. The accumulation of Treg cells that was observed in the islets and PLNs in mice models likely played a significant role in controlling anti-islet inflammation [7].

Yaochite J. et al. (2013) have shown the kinetics of Treg and Th17 subsets and disease severity during the streptozotocin (STZ)-induced diabetes mellitus [19]. Susceptible C57BL/6 mice were administered with multiple low doses of STZ and we evaluated the frequency/absolute number of these T-cell subsets in the PLNs and Th1, Th17, Treg cytokine production in the pancreatic tissue. During the initial phase of diabetes development (day 6), they noted increased numbers of CD4<sup>(+)</sup> and CD8<sup>(+)</sup> T-cells in PLNs. The numbers of Th17 cells in PLNs were enhanced too. In addition,

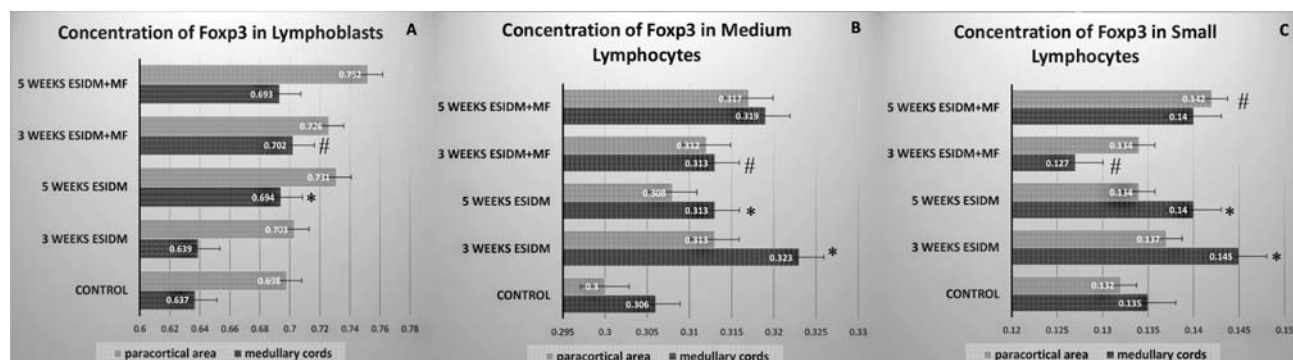


Fig. 2. Concentration of transcription factor FoxP3 (fluorescence intensity in arbitrary units, AU) in FoxP3<sup>+</sup>- Lymphoblasts (A), FoxP3<sup>+</sup>-Medium Lymphocytes (B) and FoxP3<sup>+</sup>- Small Lymphocytes (C). Note: \* – P < 0.05 relative to the control, # – P < 0.05 relative to diabetes.

the early augment of interferon gamma (IFN $\gamma$ ), tumoral necrosis factor (TNF $\alpha$ ), IL-6 and IL-17 levels in pancreatic tissue correlated with pancreatic islet inflammation and mild  $\beta$ -cell damage. Notably, the absolute number of Treg cells increased in PLNs during over time when compared to control group. Interestingly, increased IL-10 levels were associated with control of the inflammatory process during the late phase of the type 1 diabetes (day 25). Ferraro A. et al. (2011) phenotypically and functionally characterized Tregs and Th17 cells residing in the pancreatic-draining lymph nodes (PLNs) of 19 patients with type 1 diabetes and 63 nondiabetic donors and those circulating in the peripheral blood of 14 type 1 diabetic patients and 11 healthy subjects [4]. Authors have shown that the key features of the PLN of diabetic subjects are 1) an unbalanced Treg/Th17 cell ratio; 2) increased IL-17-producing CD4<sup>+</sup> T-cells in response to diabetes-related antigens; and 3) the presence of CD25<sup>bright</sup> T-cells epigenetically imprinted to be Tregs but which overall are reduced in FoxP3 expression and have a defective suppressive activity. Thus, one could speculate that certain Tregs in diabetic patients, for still unknown reasons, turn off FoxP3 expression once they migrate to the pancreas, leading to defective control of Th17 cells, which expand and cause the destruction of the pancreas by releasing IL-17. Zdravkovic N. et al. (2009) used the model of multiple low doses of streptozotocin (MLD-STZ) induced diabetes in susceptible C57BL/6 mice and resistant BALB/c mice to study these regulatory mechanisms [20]. They have shown that low dose cyclophosphamide (CY) sensitive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>Treg cell-dependent mechanisms can

be demonstrated in C57BL/6 mice susceptible to MLD-STZ diabetes induction. CY pretreatment decreased Foxp3<sup>+</sup> cell count, glycemia, glycosuria and insulinitis.

A key role is played by signaling systems acting as metabolic «sensors» linking energy/nutritional status to regulatory T-cell functions. Dynamic activity of intracellular metabolism, through mTOR modulation, might represent a shift in understanding the molecular mechanisms governing Treg cell tolerance [6]. Recent studies revealed that mTOR signaling impacts conventional T-cell homeostasis, activation and differentiation [11]. mTOR integrates nutrient sensing and signaling pathways to match the energy requirements of activated T-cells. Th1, Th2, and Th17 cells require high levels of glycolysis that is mediated by high mTOR activity, whereas Treg differentiation requires low mTOR activity, reduced glycolysis, and lipid oxidation. Consistent with the above findings, Treg display higher levels of AMP kinase activity and preferential lipid oxidation for their energy requirements [12]. The AMP-activated kinase acts as a sensor of the AMP/ATP ratio, which is increased during hypoxia and inhibits mTOR kinase to promote mitochondrial oxidative metabolism rather than glycolysis [8]. Interestingly, activation of AMP kinase via Metformin, a drug used to treat diabetes mellitus, increased the Treg population in the CD4<sup>+</sup> T-cell compartment in an *in vivo* murine model of asthma.

### Conclusion

Our results demonstrate the metformin is able to increase the Treg number in PLN, by the way these effects manifest on the third week of the diabetes mellitus and they reduce on the fifth week of the pathological process duration.

### References

- Araki, K., Ellebedy, A., & Ahmed, R. (2011). mTOR in the immune system. *Curr Opin Cell Biol*, 23(6), 707–715.
- Calderon, B., & Unanue, E. (2012). Antigen presentation events in autoimmune diabetes. *Curr Opin Immunol*, 24(1), 119–128. doi: 10.1016/j.coi.2011.11.005.
- Ferraro, A., Socci, C., Stabilini, A., Valle, A., Monti, P., Piemonti, L., et al. (2011). Expansion of Th17 cells and functional defects in T regulatory cells are key features of the pancreatic lymph nodes in patients with type 1 diabetes. *Diabetes*, 60, 2903–2913. doi: 10.2337/db11-0090.
- Ferraro, A., Socci, C., & Battaglia, M. (2011). Expansion of Th17 Cells and Functional Defects in T Regulatory Cells Are Key Features of the Pancreatic Lymph Nodes in Patients With Type 1 Diabetes. *Diabetes*, 60(11), 2903–2913. doi: 10.2337/db11-0090.
- Gagnerault, M., Luan, J., Lotton, C., & Lepault, F. (2002). Pancreatic lymph nodes are required for priming of  $\beta$  cell reactive T cells in NOD mice. *J Exp Med.*, 196, 369–377. doi: 10.1084/jem.20011353.
- Gerriets, V., & Rathmell, J. (2012). Metabolic pathways in T cell fate and function. *Trends Immunol.*, 33(4), 168–73. doi: 10.1016/j.it.2012.01.010.
- Green, E., Choi, Y., & Flavell, R. (2002). Pancreatic lymph node-derived CD4(+)CD25(+) Treg cells: highly potent regulators of diabetes that require TRANCE-RANK signals. *Immunity*, 16, 183–191. doi:10.1016/S1074-7613(02)00279-0.
- Gardie, D. (2011). AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev.*, 25, 1895–908. doi: 10.1101/gad.17420111.
- Kole, T., Zheng, Y., Zarek, P., Matthews, K., Xiao, B., Worley, P., et al. (2009). The mTOR kinase differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment. *Immunity*, 30, 832–844. doi: 10.1016/j.immuni.2009.04.014.
- Levisetti, M., Suri, A., Frederick, K., & Unanue, E. (2004). Absence of lymph nodes in NOD mice treated with lymphotoxin- $\beta$  receptor immunoglobulin protects from diabetes. *Diabetes*, 53, 3115–3119. doi:10.2337/diabetes.53.12.3115.
- MacIver, N., Michalek, R., & Rathmell, J. (2013). Metabolic regulation of T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*, 31, 259–83. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095956.
- Michalek, R., Gerriets, V., Jacobs, S., Macintyre, A., MacIver, N., Mason, E., et al. (2011). Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4<sup>+</sup> T cell subsets. *J Immunol*, 186, 3299–303. doi: 10.4049/jimmunol.1003613.
- Nasri, H., & Rafieian-Kopaei, M. (2014). Metformin: Current knowledge. *J Res Med Sci*, 19(7), 658–664.
- Nti, B., Markman, J., Bertera, S., Styche, A., Lakomy, R., Subbotin, V. et al. (2012). Treg cells in pancreatic lymph nodes: the possible role in diabetogenesis and beta cell regeneration in a T1D model. *Cell Moll Immunol*, 9, 455–463. doi: 10.1038/cmi.2012.36.
- Salmond, R., & Zamoyska, R. (2011). The influence of mTOR on T helper cell differentiation and dendritic cell function. *Eur J Immunol*, 41(8), 2137–2141. doi: 10.1002/eji.201141523.
- Tan, T., Xiang, Y., Chang, C., & Zhou, Z. (2014). Alteration of regulatory T cells in type 1 diabetes mellitus: a comprehensive review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 47(2), 234–243. doi: 10.1007/s12016-014-8440-0.
- Tonkin, D., & Haskins, K. (2009). Regulatory T cells enter the pancreas during suppression of type 1 diabetes and inhibit effector T cells and macrophages in a TGF- $\beta$ -dependent manner. *Eur J Immunol*, 39, 1313–1322. doi: 10.1002/eji.200838916.

18. Willcox, A., Richardson, S., Bone, A., Foulis, A., & Morgan, N. (2009) Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. *ClinExpImmunol*, 155, 173–181. doi: 10.1111/j.1365-2249.2008.03860.x.
19. Yaochite, J., Caliari-Oliveira, C., & Davanzo, M. (2013). Dynamic changes of the Th17/Tc17 and regulatory T cell populations interfere in the experimental autoimmune diabetes pathogenesis. *Immunobiology*, 218(3), 338–52. doi: 10.1016/j.imbio.2012.05.010.
20. Zdravkovic, N., Shahin, A., Arsenijevic, N., Lukic, M., & Mensah-Brown, E. (2009). Regulatory T cells and ST2 signaling control diabetes induction with multiple low doses of streptozotocin. *MolImmunol*, 47(1), 28–36. doi: 10.1016/j.molimm.2008.12.023.

**Information about authors:**

Putilin D.A., Assistant of the Department of Normal Physiology, Zaporizhzhia State Medical University, E-mail: des.doctor@mail.ru.

Kamyshny A.M., MD, PhD, DSci, Associate Professor, Head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, Zaporizhzhia State Medical University.

**Відомості про авторів:**

Путілін Д.А., асистент каф. нормальної фізіології, Запорізький державний медичний університет, E-mail: des.doctor@mail.ru.

Камішний О.М., д. мед. н., доцент, зав. каф. мікробіології, вірусології та імунології, Запорізький державний медичний університет.

**Сведения об авторах:**

Путилин Д.А., ассистент каф. нормальной физиологии, Запорожский государственный медицинский университет, E-mail: des.doctor@mail.ru.

Камышный А.М., д. мед. н., доцент, зав. каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии, Запорожский государственный медицинский университет.

Надійшла в редакцію 20.03.2015 р.

О. М. Грабовий<sup>1</sup>, С. А. Антонюк<sup>1</sup>, В. П. Сільченко<sup>2</sup>, Є. А. Воробей<sup>1</sup>, Т. М. Савчин<sup>1</sup>

## Питомий вміст ДНК у ядрах клітин і клітинна гетерогенність аденокарцином товстої кишки

<sup>1</sup>Національний інституту раку, м. Київ,

<sup>2</sup>Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л. Шупика, м. Київ

**Ключові слова:** аденокарцинома товстої кишки, ДНК, клітинна гетерогенність.

Визначення властивостей і тонких механізмів патогенезу є безпосередньою умовою підвищення ефективності боротьби з раком, у тому числі товстої кишки. З метою оцінювання гетерогенності клітинного складу аденокарцином товстої кишки за питомим вмістом ДНК у ядрах клітин на матеріалі 141 біопсії або вилученому під час оперативного втручання здійснили дослідження за допомогою гістологічних, гістохімічних, морфо- та денсіометричного, математичних методів. Встановили, що в аденокарциномах товстої кишки з підвищенням ступеня дедиференціювання (G) відбувається збільшення відносної частки клітин з ядрами, які найбільше відповідають функціонально активним і навпаки. Це свідчить, що клітинна гетерогенність аденокарцином товстої кишки є не лінійною, а функцією, що наближається до параболічної.

### Удельное содержание ДНК в ядрах клеток и клеточная гетерогенность аденокарцином толстой кишки

*А. Н. Грабовой, С. А. Антонюк, В. П. Сильченко, Е. А. Воробей, Т. М. Савчин*

Определение свойств и тонких механизмов патогенеза является непосредственным условием повышения эффективности борьбы с раком, в том числе толстой кишки. С целью оценить гетерогенность клеточного состава аденокарцином толстой кишки по удельному содержанию ДНК в ядрах клеток на материале 141 биопсий или взятом в ходе оперативного вмешательства провели исследование с помощью гистологических, гистохимических, морфо- и денситометрического, математических методов. Установлено, что в аденокарциномах толстой кишки по мере роста степени дедифференцировки (G) происходит увеличение относительной доли клеток с ядрами, которые наиболее соответствуют функционально активным и наоборот. Это свидетельствует, что клеточная гетерогенность аденокарцином толстой кишки является не линейной, а функцией, приближающейся к параболической.

**Ключевые слова:** аденокарцинома толстой кишки, ДНК, клеточная гетерогенность.

**Патология.** – 2015. – №1 (33). – С. 44–47

### Specific cell's nuclei DNA content and cellular heterogeneity of colon adenocarcinoma

*A. N. Grabovoy, S. A. Antoniuk, V. P. Silchenko, E. A. Vorobiei, T. M. Savchin*

Definition of properties and fine pathogenesis mechanisms is a direct condition for improving the effectiveness of the fight against cancer, including colon cancer.

Aim. In order to assess the cellular composition heterogeneity of colon adenocarcinoma (AC) on the specific DNA content in the cells' nuclei 141 biopsies were studied using histological, histochemical, morphological, densitometric and mathematical methods.

Methods and results. It was established that in AC with grade increase (G) there is an increase in the relative proportion of cells with nuclei which are most appropriate for functional activity and vice versa.

Conclusion. This suggests that AC cellular heterogeneity is not linear, and the function approximates to the parabolic one.

**Key words:** Large Intestine, Adenocarcinoma, DNA, Genetic Heterogeneity.

**Pathologia.** 2015; №1 (33): 44–47

Зміни кількості ДНК у ядрах клітин аденокарцином товстої кишки (АК) є типовим явищем, яке пов'язане передусім із хромосомною нестабільністю, котра реалізується в поліплоїдії та анеуплоїдії [1,5,7,9]. Виконано багато досліджень щодо виявлення зв'язку між вмістом ДНК (плоїдністю) в ядрах пухлинних клітин і гістологічним типом пухлини і передусім з її злоякісним потенціалом [1,9]. Дані щодо кількості ДНК у ядрах клітин і прогнозу при колоректальному раку дали підґрунтя для формування уявлення про важливість цього показника, який не є абсолютним, що пов'язано з мінливістю цього явища [7,9].

Наші спостереження [2] показали: середній вміст ДНК у ядрах пухлинних клітин виявляється найбільшим у поліпах та аденомах з осередками малігнізації (фактично аденокарциноми G1). В АК із підвищенням ступеня

дедиференціювання (G) відзначили його зменшення, як і зменшення виразності гетерогенності клітинного складу пухлин за цією ознакою. Крім того, привернула увагу доволі значна варіабельність оптичної щільності ядер пухлинних клітин при визначенні в них вмісту ДНК, що дало змогу припустити можливість використання цього показника для оцінювання клітинного складу АК.

#### Мета роботи

Оцінити гетерогенність клітинного складу аденокарцином товстої кишки за питомим вмістом ДНК у ядрах клітин.

#### Матеріали і методи дослідження

Дослідження виконані на матеріалі 141 біопсій або вилученому при оперативному втручанні від пацієнтів з АК і доброякісними новоутвореннями: 11 – контроль, умовно нормальна кишка (К), поліпи та аденоми (В) –

16; АК G1 (G1) – 28; АК G2 (G2) – 73; АК G3 (G3) – 13. Гістологічне типування пухлин здійснили з використанням рутинного забарвлення.

Матеріал фіксували в забуференому 10% формаліні з рН 7,4 та ущільнювали у парафін із застосуванням гістопроектора Histos-5 (Milestone, Italy). З парафінових блоків виготовляли зрізи завтовшки 5 мкм за допомогою мікротома Microm HM325 (Thermo Scientific, Germany). Зрізи забарвлювали гематоксилином для загального оцінювання пухлини, галоціанін-хромовим галуном за Ейнарсоном (рН 1,62, 37°C, 24 год) для виявлення вмісту нуклеїнових кислот (НК) [3,4]. Для кожного випадку частину зрізів обробляли РНКазою (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Germany) для екстракції РНК [3].

Препарати вивчали та фотографували за допомогою мікроскопа Nikon Eclipse 80i з камерою DS-5SMc/L2 за стандартизованих умов, а зображення (збільшення мікроскопа  $\times 400$ ,  $1280 \times 960$  пікселів RGB) опрацьовували із застосуванням системи аналізу ImageJ 1,46. На зображеннях із препаратів, забарвлених галоціанін-хромовим галуном, у 30 клітинах кожної пухлини визначали площу перетину ядра клітини, питому та інтегративну оптичну щільність ядра клітини, розраховували вміст у ньому кількості ДНК. Для визначення останнього як одиницю обрали вміст ДНК у ядрах лімфоцитів [2]. Клітини кожної пухлини ранжували за вмістом ДНК в ядрі. Отриману послідовність ділили на ранги із кроком, що дорівнював середньому вмісту ДНК у ядрах лімфоцитів: R1 – до 1, R2 – 1–2, R3 – 2–3 і т.д. Враховуючи, що клітини з рангом P5 і більше становили менше ніж 5%, а більшість середніх значень їхніх параметрів, які визначали, мали  $p > 0,05$ , їх зводили в один ранг P6+. За середнім вмістом ДНК у ядрах клітини пухлин поділили на 3 підгрупи: D – середній вміст ДНК у ядрах до 1,2, D+ – середній вміст ДНК у ядрах від 1,2 до 2,5, T+ – середній вміст ДНК понад 2,5 [1,2].

Статистичний аналіз виконали з використанням програмного забезпечення IBM SPSS Statistics 22. Для кореляційного аналізу застосували метод рангової кореляції за Спірманом, оскільки більшість величин не відповідали нормальному закону розподілу, що визначили за допомогою одновибіркового тесту Колмогорова – Смірнова. Для порівняння вибірок використовували Н-критерій Крускала – Уоллеса та U-критерій Манна – Уїтні. Для досліджених пухлин (130) здійснили аналіз виживаності за Каплан – Мейером з використанням лог-ранк тесту для оцінювання вірогідної різниці у групах із різною виживаністю. Для регресійного аналізу використовували метод Кокса.

### Результати та їх обговорення

Клітинний склад (спектр) пухлин, які дослідили, визначили за вмістом ДНК у ядрах їхніх клітин. Він виявляє помірний ступінь залежності від ступеня анаплазії. З підвищенням середнього значення плоідності пухлини відбувається зміщення її клітинного спектра до зростання відносної кількості клітин зі збільшеним вмістом ДНК у ядрах [2]. Спостерігали зменшення

середнього вмісту ДНК у ядрах АК із підвищенням ступеня дедиференціювання (G).

Поділ клітин на групи з умовно нормальними ядрами (Nn) й ті, ядра яких перебувають у стані пікнозу (Np) чи зазнали хроматолізу (Nl), здійснили за критеріями середньої оптичної щільності, площі перетину ядра та вмістом у ньому ДНК. Для кожного R на основі загальної вибірки вираховували середні значення площі перетину ядра та кількості ДНК. На підставі цього обраховували індекс нормальності ядра ( $N_i$ ):

$$N_i = \frac{NDNA_i \cdot NArea_R}{NDNA_R \cdot NArea_i}, \quad (1)$$

де  $N_i$  – індекс нормальності ядра клітини;  
 $NDNA_i$  – вміст ДНК у ядрі клітини;  
 $NDNA_R$  – середній вміст ДНК у ранзі R, до якого належить клітина;  
 $NArea_i$  – площа перетину ядра клітини;  
 $NArea_R$  – середнє значення площі перетину ядра в ранзі R, до якого належить клітина.

Значення  $N_i$ , що відповідали б нормальним ядрам, обрані напівемпіричним шляхом і встановлені у межах  $1,0 \pm 0,2$ . Для вибірки клітин (для кожного випадку окремо) з нормальними показниками  $N_i$  обраховували середнє значення оптичної щільності ядра, середньоквадратичне відхилення, на основі цього – мінімальне та максимальне значення. Отже, це дало змогу розширити можливості  $N_i$ . До групи клітин Nn включені ті, середня оптична щільність ядер яких лежала у межах між мінімумом і максимумом (обраховували на попередньому етапі дослідження). Ядра з щільністю понад нормальний діапазон (вище максимуму) – до групи Np (зазнали пікнозу – велика оптична щільність водночас із низькими показниками площі перетину). Клітини з ядрами, які мали оптичну щільність нижче мінімального значення визначеного діапазону, класифіковані як Nl (зазнали хроматолізу) (рис. 1). На основі результатів для кожної пухлини розраховували частки Nn, Np, Nl клітин.

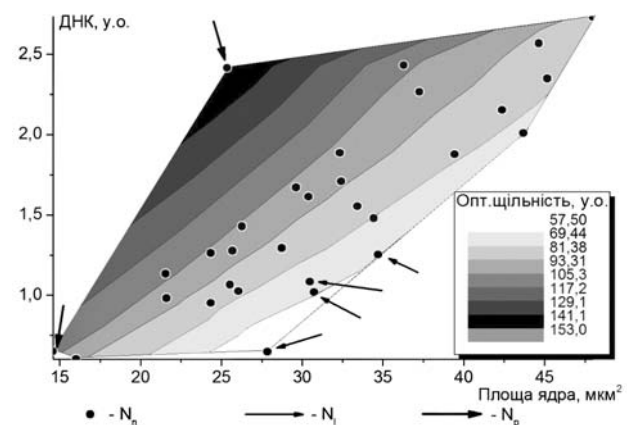


Рис. 1. Розподіл клітин аденокарцином товстої кишки у координатах кількості ДНК (у.о.), площі (мкм<sup>2</sup>) і середньої оптичної щільності ядра (у.о.).

Аналіз клітинного складу пухлин різного ступеня дедиференціювання показав збільшення відсотка клітин з умовно нормальними ядрами (Nn) із підвищенням анаплазії ( $p < 0,01$ ) (рис. 2).

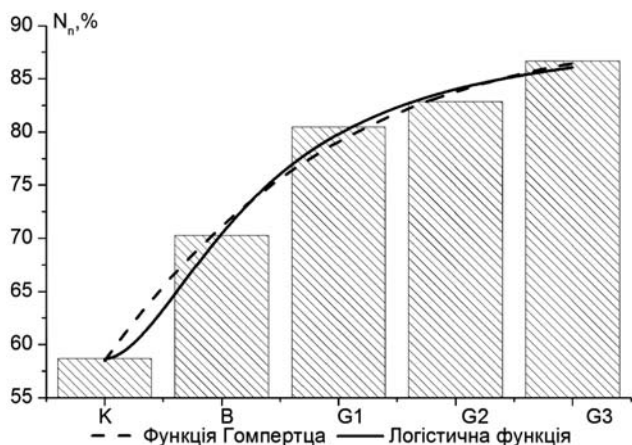


Рис. 2. Збільшення частки клітин в аденокарциномі товстої кишки з умовно нормальними ядрами (Nn) із підвищенням ступеня дедиференціювання. Столпчики гістограми – емпірично визначена частка Nn клітин у пухлині.

Примітки: К – контроль, В – доброякісні новоутворення, G1-G2-G3 – АК відповідного грейда.

Це збільшення відбувається за логістичним законом ( $R^2=0,98$ ), що найкраще описується функцією Гомпертца ( $R^2=0,99$ ), тобто швидкість зростання частки Nn клітин (приріст) є різною в різні моменти захворювання (за умови посилення анаплазії з часом існування пухлини), що нагадує криву росту популяції. Крім того, логістичний закон передбачає існування певного межового значення щільності популяції, до якого прямує логістична крива. У нашому випадку його значення становить 89,7%. Після його досягнення приріст популяції, теоретично, не відбувається, і крива виходить на плато. Точніше розуміння перебігу хвороби (від її ініціації та в періоди між стадіями розвитку) дасть можливість детально вивчити властивості кривої та детальніше описувати в математичній формі основні моменти перебігу захворювання, прогнозувати їхні наслідки.

Щодо частки Np клітин спостерігали зворотну залежність: частка таких клітин у пухлині знижується зі збільшенням G ( $p<0,01$ ) (рис. 3). Таке зниження відбувається експоненційно ( $R^2=0,99$ ).

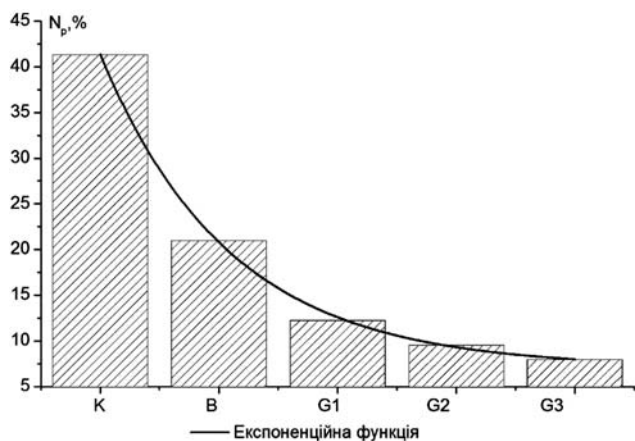


Рис. 3. Експоненційне зниження відсотка клітин з ядрами, що зазнали пікнозу (Np) у складі аденокарциноми товстої кишки зі збільшенням G. Столпчики гістограми – емпірично визначена частка Np клітин у пухлині.

Примітки: К – контроль, В – доброякісні новоутворення, G1-G2-G3 – АК відповідного грейда.

Під час оцінювання N1 клітин у складі пухлин не виявили закономірностей змін їхньої кількості, що дає змогу розглядати їх появу як випадкове явище.

Аналіз клітинного складу у групах пухлин із різною середньою плоідністю показав наявність вірогідної різниці між значеннями Nn зі збільшенням тканинної анаплазії пухлини для D+ ( $p<0,01$ ) і показниками Np ( $p<0,01$ ). Так, спостерігали підвищення Nn і зниження Np зі збільшенням G. Однак таку закономірність не визначили для диплоїдних пухлин (D), де статистично вірогідних результатів не отримали. Це можна пояснити високою ізоморфністю пухлинних клітин цієї групи. Для групи T+, де спостерігали виражену клітинну анізоморфію, також не отримали вірогідної різниці між різними G, хоча у групі простежується виражена тенденція до збільшення Nn і зниження Np.

Аналіз виживаності за методом Каплана – Мейєра не виявив її прямого зв'язку з показниками питомої оптичної щільності ядер за вмістом ДНК і клітинним складом пухлини за цією ознакою.

Отже, дослідження показали, що з підвищенням ступеня дедиференціювання АК відбувається збільшення відносної частки клітин з ядрами, що найбільш відповідають функціонально активним, а відносна кількість клітин, ядра яких не відповідають критеріям життєздатності, зменшується. Це збігається з характером змін клітинного спектра АК за вмістом ДНК у ядрах пухлинних клітин, коли в АК G3, у порівнянні з більш диференційованими, він звужується [2]. Наведене є прямим відображенням концепції клональної еволюції пухлин [6, 10] і показує поступове набуття домінування в АК клону(ів) з ефективними системами життєзабезпечення і, можливо, зі стабілізованим геномом. З цих позицій клітинну гетерогенність [8] АК треба розглядати як не лінійну, а параболічну функцію. Відповідно, на певному етапі розвитку (пухлинної прогресії) виразність гетерогенності досягає максимуму. Паралельно клональна еволюція отримує максимум субстрату для реалізації відбору, і зі складу пухлини елімінуються нежиттєздатні морфофункціональні типи пухлин. Поряд з тим із клітинного різноманіття виділяються такі, що, маючи спотворений генотип (забезпечує високу проліферативну активність зі збереженням систем життєзабезпечення та втратою специфічних функцій інтегрування у тканинні комплекси), є основою для виникнення стійких клонів, які здатні до необмеженого існування.

### Висновки

В аденокарциномах товстої кишки з підвищенням ступеня дедиференціювання (G) відбувається збільшення відносної частки клітин з ядрами, що найбільше відповідають функціонально активним і навпаки.

Елімінація нежиттєздатних морфофункціональних типів пухлинних клітин в аденокарциномах товстої кишки відбувається одночасно зі зростанням ступеня її клітинної гетерогенності. Досягнення рівноваги між цими процесами є періодом, після якого в пухлині починає зменшуватися рівень клітинної гетерогенності. Відповідно, клітинна гетерогенність аденокарцином є не лінійною, а функцією, що наближається до параболічної.

### Список літератури

1. Автандилов Г.Г. Диагностическая медицинская плоидометрия / Г.Г. Автандилов. – М. : Медицина, 2006. – 192 с.
2. Грабовий О.М. Вміст нуклеїнових кислот у ядрах клітин епітеліальних пухлин товстої кишки / О.М. Грабовий, С.А. Антонюк, Є.А. Воробей // Український морфологічний альманах. – 2013. – №1. – С. 73–76.
3. Лупа Х. Основы гистохимии : пер. с нем. / Х. Лупа. – М. : Мир, 1980. – 344 с.
4. Ташке К. Введение в количественную цито-гистологическую морфологию : пер. с рум. / К. Ташке. – М. : Изд. Акад. Соц. Респ. Румынии, 1980. – 192 с.
5. Davoli T. The Causes and Consequences of Polyploidy in Normal Development and Cancer / T. Davoli, T. de Lange // *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* – 2011. – Vol. 27. – P. 585–610.
6. Greaves M. Clonal evolution in cancer / M. Greaves, C.C. Malley // *Nature*. – 2012. – Vol. 481. – №7381. – P. 306–313.
7. Holland A. Losing balance: the origin and impact of aneuploidy in cancer / A. Holland, D. Cleveland // *EMBO*. – 2012. – Vol. 13. – P. 501–514.
8. Cancer heterogeneity—a multifaceted view / F.D.S.E. Melo, L. Vermeulen, E. Fessler, J.P. Medema // *EMBO reports*. – 2013. – Vol. 14(8). – P. 686–695.
9. Effects of Chromosomal Polyploidy on Survival of Colon Cancer Cells / S. Park, E. Choi, Y. Jang et al. // *Korean J. Gastroenterol.* – 2011. – Vol. 57(3). – P. 150–157.
10. Visvader J.E. Cells of origin in cancer / J.E. Visvader // *Nature*. – 2011. – Vol. 469(7330). – P. 314–322.

### References

1. Avtandilov, G. G. (2006). *Diagnosticheskaya medicinskaya ploidometriya [Diagnostic medical ploidyometry]*. Moscow: Medicina. [in Russian].
2. Hrabovyi, O.M., Antoniuk, S. A., Vorobiei, Ye. A. (2013). Vmist nukleinovyykh kyslot u yadrakh klityn epitelialnykh pukhlyn tovstoi kyshky [Nucleic acids contents in the colon epithelial tumor cells nuclei]. *Ukrainskyi morfologichnyi almanakh*, 11(1), 73–76. [in Ukrainian].
3. Lupa, Kh. (1980) *Osnovy khistokhimii [Basic histochemistry]*. Moscow: Myr. [in Russian].
4. Tashke, K. (1980). *Vvedenie v kolichestvennyuyu cito-gistologicheskuyu morfologiyu. [Introduction to quantitative cytological morphology]*. Moscow. [in Russian].
5. Davoli, T., & de Lange, T. (2011). The Causes and Consequences of Polyploidy in Normal Development and Cancer. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.*, 27, 585–610. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154234.
6. Greaves, M., & Malley, C. C. (2012) Clonal evolution in cancer. *Nature*, 481(7381), 306–313. doi: 10.1038/nature10762.
7. Holland, A., & Cleveland, D. (2012) Losing balance: the origin and impact of aneuploidy in cancer. *EMBO*, 13, 501–514. doi: 10.1038/embor.2012.55.
8. Melo, F. D. S. E., Vermeulen, L., Fessler, E., & Medema, J. P. (2013) Cancer heterogeneity – a multifaceted view. *EMBO*, 14(8), 686–695. doi: 10.1038/embor.2013.92.
9. Park, S., Choi, E., Jang, Y., Hong, S. H., Kim, I. H., & Chang, D. K. (2011). Effects of Chromosomal Polyploidy on Survival of Colon Cancer Cells. *Korean J. Gastroenterol.*, 57(3), 150–157. doi: 10.4166/2011.57.3.150.
10. Visvader, J. E. (2011) Cells of origin in cancer. *Nature*, 469(7330), 314–322. doi: 10.1038/nature09781.

### Відомості про авторів:

Грабовий О.М., д. мед. н., професор, зав. науково-дослідного відділу патологічної анатомії, Національний інститут раку, E-mail: agrabovoy@yandex.ru.

Антонюк С.А., м.н.с. н.-д. відділу патологічної анатомії, Національний інститут раку.

Сільченко В.П., д. мед. н., професор, зав. каф. патологічної та топографічної анатомії, Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л. Шупика.

Воробей Є.А., ст. лаборант з вищою освітою н.-д. відділу патологічної анатомії, Національний інститут раку.

Савчин Т.М., дипломант н.-д. відділу патологічної анатомії, Національний інститут раку.

### Сведения об авторах:

Грабовой А.Н., д. мед. н., профессор, зав. научно-исследовательским отделом патологической анатомии, Национальный институт рака, E-mail: agrabovoy@yandex.ru.

Антонюк С.А., м.н.с. н.-и. отдела патологической анатомии, Национальный институт рака.

Сильченко В.П., д. мед. н., профессор, зав. каф. патологической и топографической анатомии, Национальная медицинская академия последипломного образования имени П.Л. Шупика.

Воробей Е.А., ст. лаборант с высшим образованием н.-и. отдела патологической анатомии, Национальный институт рака.

Савчин Т.М., дипломант н.-и. отдела патологической анатомии, Национальный институт рака.

### Information about authors:

Grabovoy A.N., MD, PhD, DScM, Professor, Head of The Research Department of Anatomical Pathology, Ukrainian National Cancer Institute, E-mail: agrabovoy@yandex.ru.

Antoniuk S.A., MD, Researcher of The Research Department of Anatomical Pathology, Ukrainian National Cancer Institute.

Silchenko V.P., MD, PhD, DScM, Professor, Head of the Department of Pathologic and Topographic Anatomy, Shupik National Medical Academy of Postgraduate Education.

Vorobiei E.A., Senior researcher assistant of The Research Department of Anatomical Pathology, Ukrainian National Cancer Institute.

Savchin T.M., Writer of a university degree thesis of The Research Department of Anatomical Pathology, Ukrainian National Cancer Institute.

Надійшла в редакцію 27.03.2015 р.

УДК 618.36+618.14+616-091.8-006.36

Т. Д. Задорожна, В. В. Подольський, О. І. Парницька, О. І. Єщенко, С. М. Килихевич, Т. М. Арчакова,  
Ю. В. Давидова, Н. Я. Скрипченко, Г. О. Гребініченко

## Морфологічні та імуногістохімічні особливості плацентарно-ендометріальних структур при доброякісних і злоякісних пухлинах у жінок

ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології НАМН України», м. Київ

**Ключові слова:** плацента, ендометрій, онкомаркери.

З метою визначення предикторів патологічних станів у плаценті та ендометрії жінок, яких прооперували з приводу раку щитовидної залози, здійснили порівняльне дослідження плацент та ендометрію жінок, яким виконали оперативне втручання у зв'язку з наявністю папілярної карциноми (інкапсульованої), й ендометрію від жінок із доброякісними пухлинами матки (лейоміома). Протягом дослідження використали загальногістологічні методи, а також імуногістохімічний метод виявлення експресії з МКАТ Ki67 Clon MIB-1, p53 Clon DO-7, PEA, Cytokeratin AE1/AE3, Vimentin Clone v9, рецепторів до естрогенів і прогестерону. Встановили предиктори плацентарно-ендометріальних порушень при онкопатології у жінок: збільшення відносного обсягу експресії у плаценті та ендометрії проліферативного маркера Ki-67 та онкомаркера p53, що призводить до порушення процесів регенерації; дисхроноз показників експресії рецепторів до естрогенів і прогестерону в ендометрії; наявність експресії PEA у 25% жінок основної групи як в ендометрії, так і в плаценті; наявність атипової залозистої гіперплазії, поліпозу та мікрополіпозу ендометрію, які мають значення в розвитку онкопатології.

### Морфологические и иммуногистохимические особенности плацентарно-эндометриальных структур при доброкачественных и злокачественных опухолях у женщин

Т. Д. Задорожная, В. В. Подольский, О. И. Парницкая, О. И. Ещенко, С. Н. Килихевич, Т. Н. Арчакова, Ю. В. Давыдова, Н. Я. Скрипченко, А. А. Гребиниченко

С целью определения предикторов патологических состояний в плаценте и эндометрии женщин, прооперированных по поводу рака щитовидной железы, выполнили сравнительное исследование плацент и эндометрия женщин, которым проведено оперативное вмешательство в связи с наличием папиллярной карциномы (инкапсулированной), и эндометрия от женщин с доброкачественными опухолями матки (лейомиома). В исследовании использованы общегистологические методы, а также иммуногистохимический метод определения экспрессии с МКАТ Ki67 Clon MIB-1, p53 Clon DO-7, PEA, Cytokeratin AE1/AE3, Vimentin Clone v9, рецепторов к эстрогенам и прогестерону. Установлены предикторы плацентарно-эндометриальных нарушений при онкопатологии у женщин: увеличение относительного объема экспрессии в плаценте и эндометрии пролиферативного маркера Ki-67 и онкомаркера p53, что приводит к нарушению процессов регенерации; дисхронизация показателей экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестерона в эндометрии; наличие экспрессии PEA у 25% женщин основной группы как в эндометрии, так и в плаценте; наличие атипичной железистой гиперплазии, полипоза и микрополипоза эндометрия, которые имеют значение в развитии онкопатологии.

**Ключевые слова:** плацента, эндометрий, онкомаркеры.

**Патология.** – 2015. – №1 (33). – С. 48–52

### Morphological and immunohistochemical peculiarities of placental-endometrial structures in women with benign and malignant tumors

T. D. Zadorozhna, V. V. Podolsky, O. I. Parnytska, O. I. Eschenko, S. M. Kylyhevich, T. M. Archakova, Yu. V. Davydova, N. Ya. Skrypchenko, G. O. Grebinychenko

Aim. Research materials were the placenta of women operated on papillary carcinoma (encapsulated), endometrium of women with the same tumor markers detected in the placenta, this endometrium were taken during diagnosing postpartum catamnesis of the state of reproductive health, in comparison to the endometrium of women with benign uterine tumors (leiomyoma).

Methods and results. Methods, that were used in the study: histological, immunohistochemical – indirect streptavidin-peroxidase method for detecting the expression of Ki67 Clon MIB-1, p53 Clon: DO-7, REA, Cytoceratina AE1 / AE3; Vimentin Clone: v9, receptors for estrogen (RE) and progesterone (RP). The study evaluated predictors of placental-endometrial disorders in women with cancer pathology: elevation of relative amount of expression of proliferative marker Ki-67 and p53 tumor marker in the placenta and endometrium, leading to violations in the structure of the process of regeneration; dischronosis in levels of expression of estrogen and progesterone receptors in the endometrium; presence of CEA expression in 25% of women of the main group in the endometrium and placenta; atypical glandular hyperplasia, endometrial polyps and micropolyps were found, which are important in the development of oncologic pathology.

**Key words:** Placenta, Endometrium, Biological Tumor Markers.

**Pathologia.** 2015; №1 (33): 48–52

Дослідження останніх років засвідчили, що плацента є одним із предикторів здоров'я дитини у майбутньому. Більше ніж у 20 країнах світу вивчають зміни плаценти за наявності преєклампсії вагітних. Перші результати показали роль плацентарних факторів

у виникненні серцево-судинної патології, цукрового діабету 2 типу в дитини [1].

Ми здійснили дослідження й опублікували відомості щодо морфологічних та імуногістохімічних особливостей плацентарного бар'єра у жінок, яким виконали



оперативні втручання з приводу раку щитовидної залози. Протягом дослідження виявили імуногістохімічні зміни онкомаркерів у хоріальних структурах із наявністю експресії СЕА (карциноембріональний антиген), р53 (онкомаркер), проліферативних маркерів (PCNA, Ki-67), цитокератину YII і Vimentin [2,3].

Оскільки формування плаценти відбувається в ендометрії, що є однією з найбільш динамічних тканин організму жінки, зміни в цій структурі можуть бути важливими в розвитку плаценти, яка, своєю чергою, забезпечує формування та дозрівання плода протягом усієї фізіологічної гестації. Отже, зміни у структурі плаценти та ендометрію можуть зумовлювати порушення адаптації в перинатальному періоді та виникнення захворювань у дитини.

За даними епідеміологічних досліджень, нині відзначається збільшення частоти онкологічних захворювань у жінок репродуктивного віку.

Пропонуємо нову концепцію дослідження з визначенням ендометріально-плацентарних онкомаркерів для розроблення предикторів патологічних змін при онкопатології в матері. Такі дослідження базуються на фундаментальних даних, що одержали в інституті та лабораторії протягом декількох десятиріч; у результаті вивчення змін у плацентарному бар'єрі виявили особливості онкомаркерів у них у динаміці гестації. В останні роки встановлено, що плацентарний бар'єр є проникним для метастазів при пухлинах, що виникли під час вагітності [4].

У зв'язку з аварією на ЧАЕС в Україні вірогідно збільшилась кількість пухлин щитовидної залози, а отже звернули увагу на вагітних, які перенесли операції у зв'язку з цією патологією.

#### Мета роботи

Виявлення предикторів патологічних станів у плаценті (I етап дослідження) та ендометрії (II етап) жінок, які прооперовані з приводу раку щитовидної залози.

#### Матеріали і методи дослідження

Матеріал I етапу – плаценти жінок, яким виконали оперативне втручання з приводу папілярної карциноми (інкапсульованої) T1.NO.MO. В I спостереженні виявили інвазію в капсулу щитовидної залози. Діагноз верифікували в лабораторії морфології Інституту ендокринології НАМНУ (керівник – професор Т.І. Богданова). Паралельно верифікацію здійснили міжнародні експерти за банком даних раку щитовидної залози у порівнянні з контролем.

На II етапі дослідили ендометрій жінок, який поділили на 2 групи: основна (15 спостережень) – ендометрій від жінок, які прооперовані з приводу раку щитовидної залози, з наявністю онкомаркерів у плаценті; група порівняння (12 випадків) – ендометрій від жінок із доброякісними пухлинами матки (лейоміома).

Плаценти вивчали за протоколом, який включає дані органометричних, макроскопічних і мікроскопічних досліджень (форма № 013-2/0, що затверджена наказом МОЗ України №417 від 19.08.04 р.). Ендометрій досліджували згідно з протоколом: матеріал (пайпель-біопсія) взятий у лютеїновій фазі менструального циклу (на 20–22 д.м.ц.) із наступною фіксацією в 10% забуференому формаліні. Забір матеріалу слизової оболонки матки виконали відповідно до медичних показань у зв'язку зі зверненням цих жінок за консультацією в клініку інституту.

У дослідженні використали гістологічні методи (забарвлення гематоксилін-еозином і за ван Гізоном), а також імуногістохімічний метод – непрямий стрептавідин-пероксидазний метод виявлення експресії маркерів проліферації Anti Human Ki67 Clon MIB-1 (Dako), онкомаркерів Anti Human p53 Protein Clon: DO-7 (Dako); Anti Human CEA Carcinoembryonic Antigen (Dako); маркера клітинного диференціювання Cytokeratin AE1/AE3 (Emergo Europe) та мезенхімального фактора Mouse Anti-Swine Vimentin Clone: v9 (Dako). Імуногістохімічні дослідження виконали на парафінових зрізах. Інтенсивність реакції оцінювали в балах, поширеність – у відсотках. Також застосували кількісний метод визначення проліферативного індексу – кількість Ki-67-позитивних ядер на 100 досліджених клітин.

Статистичне опрацювання виконали за допомогою прикладних програм MS® Excel® 2003™ та SigmaPlot® 13.0. Вірогідність даних для незалежних вибірок вираховували із застосуванням одновибіркового t-критерію Student. Рівень довіри при обчисленні довірчих інтервалів визначали за методом нормального розподілу Вальда.

**Результати та їх обговорення**

Оскільки результати дослідження морфологічних та імуногістохімічних особливостей плацентарного бар'єра в жінок з онкопатологією щитовидної залози описані раніше [2,3], відомості, які є важливими для порівняння зі змінами у структурах ендометрію через 5 років після пологів, наведені в *таблицях 1, 2*.

Таблиця 1

#### Морфологічні ознаки змін у плацентарному бар'єрі жінок з онкопатологією

Морфологічні ознаки змін	
Група порівняння (39–40 тижнів)	Основна група (39–40 тижнів)
Гістологічні	
Гістологічні особливості змін відповідали терміну гестації.	Порушення мікроциркуляції з крововиливами та надмірним відкладанням позаворсинчастого фібриноїду з наявністю пікнозу та проліферації ядер епітелію ворсин.

Особливо важливими були зміни, які імуногістохімічно виявили у плацентарному бар'єрі жінок основної групи досліджень, проліферативного маркера Ki-67, що експресується в ядрах синцитію ворсин і є функціонально значущою структурою у процесах плацентарно-плодового обміну. Значним порушенням у цій групі дослідження можна вважати виявлення онкомаркера PEA (раково-ембріональний антиген) у

**Імуногістохімічні ознаки змін у плацентарному бар'єрі жінок з онкопатологією**

Імуногістохімічні ознаки змін			
Ядерні маркери			
Група порівняння		Основна група	
Проліферативний маркер Ki-67 (поширеність у %)			
Слабкопозитивна експресія в ядрах клітин строми та синцитіотрофобласта.	10	Виразна експресія в ядрах цитотрофобласта клітин строми та ендотелію судин, що підтверджується вірогідним збільшенням проліферативного індексу, котрий утрічі перевищує показник групи контролю.	30
Ген-онкосупресор із проапоптотичними властивостями (wt p 53) (бали)			
Слабка виразна реакція в окремих ядрах синцитію, строми та ендотелію судин.	1	Експресія p53 мала вогнищевий, помірний характер у ядрах позаворсинчастого, ворсинчастого трофобласта і в ядрах клітин строми.	2,5
Цитоплазматичні маркери			
Група порівняння		Основна група	
Маркер росту пухлин PEA (раковомембрональний антиген) (бали)			
Негативна реакція (0 балів).	0	Виразна імунореактивність маркера росту пухлини PEA в цитоплазмі епітелію ворсин стромальних клітинних елементів (клітини Кашченко – Гофбауера, фібробласти).	3
Маркер клітинного диференціювання цитокератин (бали)			
Слабкопозитивна експресія в синцитії ворсинок, в інших структурах плацентарного бар'єра не виявлена.	0–1	Маркер клітинного диференціювання – цитокератин – мав виразну експресію в епітеліальних структурах із порушенням архітекtonіки.	2

синцитії ворсин та ендотелії фетальних судин, оскільки PEA не визначили у плацентах жінок групи порівняння (без патології та з лейоміомами матки). В основній групі дослідження привертає увагу збільшення інтенсивності експресії онкомаркера p53 в ядрах клітин плацентарного бар'єра.

На II етапі дослідження здійснили аналіз клінічних даних, а також дослідили відповідні імуногістохімічні параметри в ендометрії жінок фертильного віку з наявністю онкомаркерів у плаценті. Аналіз клінічних даних показав, що вік жінок становив від 18 до 25 років (табл. 3). Перинатальних втрат не було. У терміні гестації 37–38 тижнів народились 74,8% дітей (доношені), передчасні пологи в терміні гестації 36 тижнів становили 25,2% спостережень.

Таблиця 3

**Поділ жінок фертильного віку з наявністю онкомаркерів у плаценті за віком абс. ч., %**

Вік, роки	Група жінок фертильного віку з наявністю онкомаркерів у плаценті			
	Група порівняння		Основна група	
	Абс. ч.	%	Абс. ч.	%
15–19	-	-	2	13,3 (3,9–30,5)
20–25	-	-	8	53,3 (28,1–78,6)
26–30	3	25,0 (0,5–49,5)	5	33,3 (9,5–57,2)
31–35	5	41,7 (13,8–69,6)	-	-
36–40	3	25,0 (0,5–49,5)	-	-
41–45	1	8,3 (7,3–23,9)	-	-
46–49	-	-	-	-

Примітки: вірогідність вибірки –  $p = 0,0174$ ;  $p = 0,0510$ .

Аналіз гістологічних даних дослідження ендометрію виявив, що майже в усіх жінок основної групи була атипова, комплексна залозиста та кістозна гіперплазія (рис. 1), поліпоз, мікрополіпоз, а також вогнища гіпоплазії та дисхроноз розвитку залоз (табл. 4).

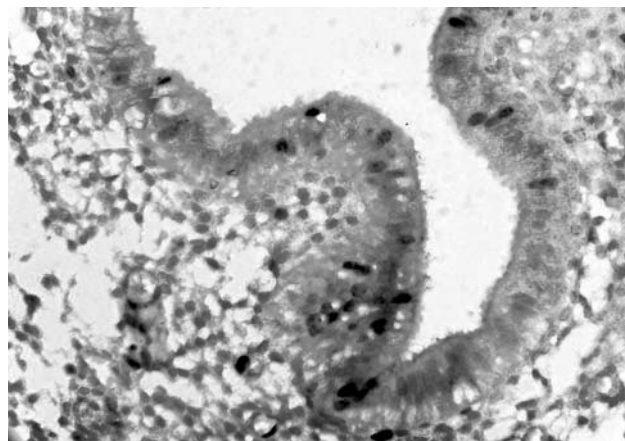


Рис. 1. Ендометрій жінки основної групи. Комплексна, залозиста вогнищева гіперплазія. Забарвлення гематоксилін-еозином. Мікрофотографія. Ок.10; об.20.

Таблиця 4

**Морфологічні особливості ендометрію жінок із наявністю онкомаркерів у плаценті**

Групи	Морфологічні ознаки змін				
	Гіперплазія	Поліпи	Мікрополіпи	Гіпоплазія	Дисхроноз
Основна	Атипова, залозисто-кістозна, вогнищева (10%)	25%	37,5%	25%	12,5%
Порівняння	0	0	0	0	0

Імуногістохімічне дослідження експресії до рецепторів естрогену та прогестеронів виявило нерівномірність їх розподілу (табл. 5) в основній групі між ядрами епітелію залоз (RP – 81,1%) та 26% в ядрах стромальних клітин (рис. 2). RE 80,2% – в ядрах епітелію залоз, 40% – в ядрах клітин строми (рис. 3).

Експресія проліферативного маркера Ki-67 вірогідно вища, ніж у групі порівняння (рис. 4), виявлена в ядрах епітелію залоз, нижча – в ядрах клітин строми, що підтверджується індексом проліферації (табл. 5). Також виявили нерівномірну експресію ядерного антигена p53 в епітелії залоз і строми (табл. 5, рис. 5).

Таблиця 5

**Імуногістохімічні особливості ядерних маркерів в ендометрії жінок із наявністю онкомаркерів у плаценті**

Групи	Імуногістохімічні ознаки змін ядерних маркерів							
	Ki-67		RP		RE		P53	
	Залози	Строма	Залози	Строма	Залози	Строма	Залози	Строма
Основна	23	12	82	26	80	40	36	14
Порівняння	8	1	49	51	63	40	1	0

Серед цитоплазматичних онкомаркерів особливо важливим є PEA, що включений у діагностичну панель. Його виявили у 25% спостережень у цитоплазмі епітелію залоз в основній групі дослідження (табл. 6, рис. 6).

Таблиця 6

**Імуногістохімічні особливості цитоплазматичних маркерів в ендометрії жінок із наявністю онкомаркерів у плаценті**

Групи	Імуногістохімічні ознаки змін цитоплазматичних маркерів			
	PEA		Панцитокератин	Vimentin
	Залози	Строма	В епітелії залоз	У стромі
Основна	25	14	2–3	1–2
Порівняння	0	0	0±1	1

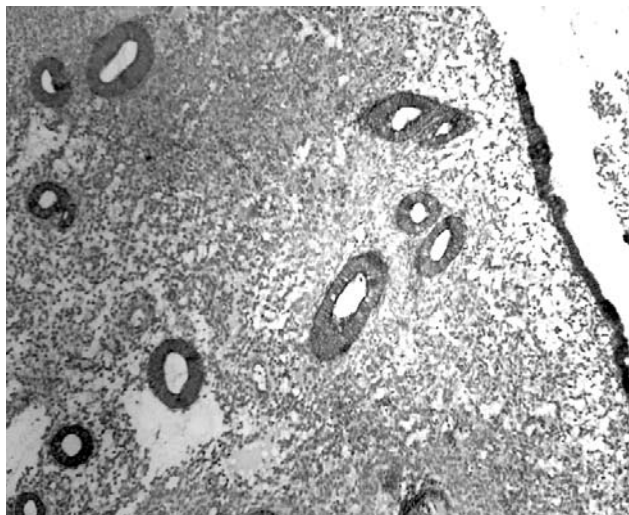


Рис. 6. Ендометрій жінки основної групи. Вогнище виразної експресії PEA в цитоплазмі епітелію залоз. Імуногістохімічний метод виявлення експресії з МКАТ PEA. Забарвлення метиленовим зеленим. Мікрофотографія. Ок. 10 Об. 20.

Поряд із позитивною експресією PEA та p53 у структурах ендометрію основної групи виявили виразну експресію панцитокератину (рис. 7) в епітелії залоз ендометрію (нерівномірну) у групі порівняння.

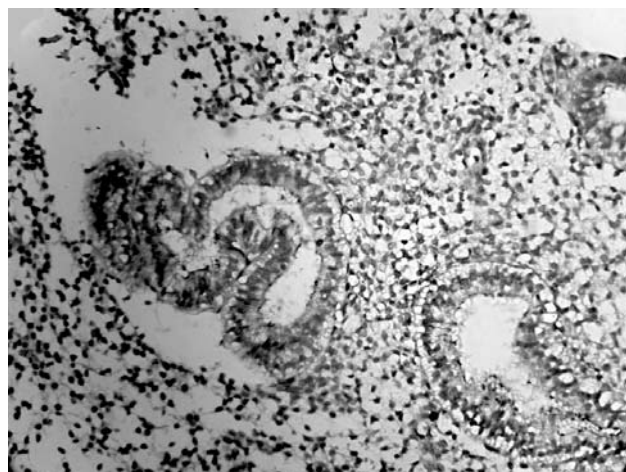


Рис. 7. Ендометрій жінки основної групи. Експресія панцитокератину в цитоплазмі епітелію залоз. Імуногістохімічний метод виявлення експресії з МКАТ панцитокератину. Забарвлення метиленовим зеленим. Мікрофотографія. Ок. 10 Об. 20.

Експресія мезенхімального маркера Vimentin була нерівномірною в мембранних структурах ендометрію в основній групі, дещо менш виразною – у групі порівняння (рис. 8).

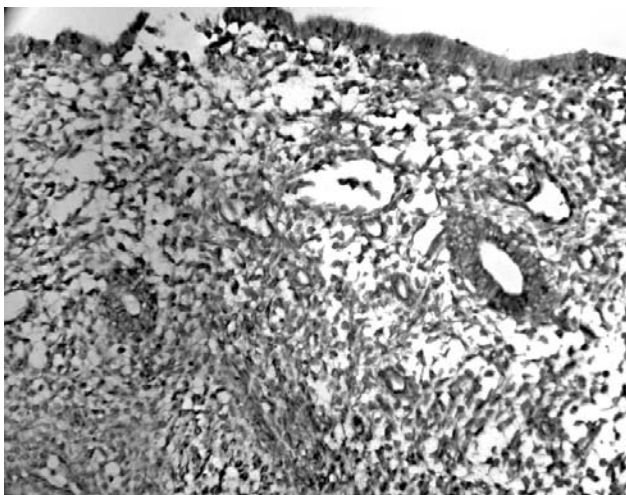


Рис. 8. Ендометрій жінки основної групи. Експресія Vimentin. Імуногістохімічний метод виявлення експресії з МКАТ Vimentin. Забарвлення метиленовим зеленим. Мікрофотографія. Ок. 10 Об. 20.

Аналіз результатів показав, що майже в усіх жінок основної групи були атипова, комплексна залозиста та кістозна гіперплазія, поліпоз, мікрополіпоз на тлі дисхронозу показників експресії рецепторів до естрогенів і прогестерону в ендометрії. Особливу увагу слід звернути на збільшення відносного обсягу експресії у плаценті та ендометрії проліферативного маркера Ki-67 та онкомаркера p53, що призводить до порушень процесів регенерації, а також на наявність експресії PEA у 25% жінок основної групи як в ендометрії, так і в плаценті.

**Висновки**

У результаті дослідження встановили предиктори плацентарно-ендометриальних порушень при онкопатології в жінок:

1. Збільшення експресії у плаценті й ендометрії проліферативного маркера Ki-67 та онкомаркера p53, що призводить до порушень процесів регенерації, а також наявність експресії PEA як в ендометрії, так і в плаценті.
2. Дисхроноз показників експресії рецепторів до естрогенів і прогестерону в ендометрії.
3. Наявність атипової залозистої гіперплазії, поліпозу та мікрополіпозу ендометрію, що мають значення в розвитку онкопатології.

## Список літератури

1. IFPA Meeting 2011 workshop report I: Placenta: Predicting future health; roles of lipids in the growth and development of feto-placental unit; placental nutrient sensing; placental research to solve clinical problems--a translational approach / G. Acharya, C. Albrecht, S.J. Benton, et.al. // *Placenta*. – 2012. – Vol. 33. – S4-S8.
2. Морфологические и иммуногистохимические особенности онкомаркеров в плацентарном барьере / Т.Д. Задорожная, В.В. Подольский, О.И. Ещенко, Т.Н. Арчакова, С.М. Килихевич, О.И. Парницкая, Ю.В. Давыдова, А.А. Гребиниченко, Е.А. Пасечник // *Патология*. – 2012. – №1(24). – С. 38–41.
3. Zadorozhna T. Immunohistochemical peculiarities of placental oncomarkers by pathological changes / T. Zadorozhna, V. Podolsky, O. Eschenko // *Placenta*. – 2012. – Vol. 33. – №9. – A. 23.
4. Baergen, Rebecca N. *Manual of Pathology of the Human Placenta* / N. Rebecca Baergen, – N.Y. : Springer, 2011. – 520 p.

## References

1. Acharya, G., Albrecht, C., Benton, S. J., Cotechini, T., Dechend, R., Dilworth, M. R., et al. (2012) IFPA Meeting 2011 workshop report I: Placenta: Predicting future health; roles of lipids in the growth and development of feto-placental unit; placental nutrient sensing; placental research to solve clinical problems--a translational approach. *Placenta*, 33, 4–8. doi: 10.1016/j.placenta.2011.11.015
2. Zadorozhnaya, T.D., Podolsky, V.V., Eshchenko, O.I., Archakova, T.N., Kilykhevich, S.M., Parnitskaya, O.I., Davydova, Yu.V., Grebinichenko, A.A., & Pasechnik, E.A. (2012) Morfologicheskie i immunogistokhimicheskie osobennosti onkomarkerov v placentarnom baryere [Morphological and immunohistochemical peculiarities of oncomarkers in placental barrier]. *Patologiya*, 1, 38–41. [in Ukrainian].
3. Zadorozhna, T., Podolsky, V., & Eschenko, O. (2012) Immunohistochemical peculiarities of placental oncomarkers by pathological changes. *Placenta*, 33(9), 23.
4. Baergen, Rebecca N. (2011) *Manual of Pathology of the Human Placenta*. N.Y. : Springer.

## Відомості про авторів:

Задорожна Т.Д., д. мед. н., професор, зав. лабораторії патоморфології, ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології НАМН України», E-mail: tdz2013@gmail.com.

Подольський В.В., к. мед. н., зав. відділення проблем здоров'я жінки фертильного віку», ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології НАМН України», керівник наукової групи.

Парницька О.І., к. мед. н., ст. наук співроб. лабораторії патоморфології, ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології НАМН України».

Єщенко О.І., к. мед. н., ст. наук співроб. лабораторії патоморфології, ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології НАМН України».

Килихевич С.М., к. мед. н., наук співроб. лабораторії патоморфології, ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології НАМН України».

Арчакова Т.М., к. мед. н., ст. наук співроб. лабораторії патоморфології, ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології НАМН України».

Давидова Ю.В., д. мед. н., професор, зав. відділення акушерських проблем екстрагенітальної патології, ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології НАМН України».

Скрипченко Н.Я., д. мед. н., професор, керівник відділення впровадження та вивчення ефективності сучасних медичних технологій в акушерстві та перинатології, ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології НАМН України».

Гребиниченко Г.О., к. мед. н., ст. наук співроб. відділення медицини плода, ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології НАМН України».

## Сведения об авторах:

Задорожная Т.Д., д. мед. н., профессор, зав. лабораторией патоморфологии, ГУ «Институт педиатрии, акушерства и гинекологии НАМН Украины», E-mail: tdz2013@gmail.com.

Подольский В.В., к. мед. н., зав. отделением проблем здоровья женщины фертильного возраста, ГУ «Институт педиатрии, акушерства и гинекологии НАМН Украины», руководитель научной группы.

Парницкая О.И., к. мед. н., ст. научн. сотр. лаборатории патоморфологии, ГУ «Институт педиатрии, акушерства и гинекологии НАМН Украины».

Ещенко О.И., к. мед. н., ст. научн. сотр. лаборатории патоморфологии, ГУ «Институт педиатрии, акушерства и гинекологии НАМН Украины».

Килихевич С.М., к. мед. н., научн. сотр. лаборатории патоморфологии, ГУ «Институт педиатрии, акушерства и гинекологии НАМН Украины».

Арчакова Т.Н., к. мед. н., ст. научн. сотр. лаборатории патоморфологии, ГУ «Институт педиатрии, акушерства и гинекологии НАМН Украины».

Давыдова Ю.В., д. мед. н., профессор, зав. отделением акушерских проблем экстрагенитальной патологии, ГУ «Институт педиатрии, акушерства и гинекологии НАМН Украины».

Скрипченко Н.Я., д. мед. н., профессор, руководитель отделения внедрения и изучения эффективности современных медицинских технологий в акушерстве и перинатологии, ГУ «Институт педиатрии, акушерства и гинекологии НАМН Украины».

Гребиниченко А.А., к. мед. н., ст. научн. сотрудник отделения медицины плода, ГУ «Институт педиатрии, акушерства и гинекологии НАМН Украины».

## Information about authors:

Zadorozhna T.D., head. Laboratory of Pathology SI «Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology Medical Science of Ukraine», m. Kyiv, d.med.nauk professor. E-mail: tdz2013@gmail.com.

Podolsky V.V., Head of clinical unit of Department of Health problems of fertile aged women SI «Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology of National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kyiv, Head of the scientific group, candidate of medical sciences.

Parnytska O.I., st.nauk. Rob co., Laboratory of Pathology SI «Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology Medical Science of Ukraine», m. Kyiv, k.med.nauk.

Eschenko O.I., st.nauk.spivrob. Laboratory of Pathology SI «Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology Medical Science of Ukraine», m. Kyiv, k.med.nauk.

Kylyhevych S.M., Researcher, Laboratory of Pathology SI «Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology Medical Science of Ukraine», m. Kyiv, k.med.nauk.

Archakov T.M., st.nauk.spivrob. Laboratory of Pathology SI «Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology Medical Science of Ukraine», m. Kyiv, k.med.nauk.

Davydova Ju. V., MD, professor of obstetrics zav.viddilennyam problems extragenital pathology,

Skrypchenko N.Y., Head of the introduction and study of the effectiveness of modern medical technology in obstetrics and perinatology, d.med.nauk Professor SI «IPAHNAMN Ukraine», m. Kyiv.

Grebinychenko G. O., senior researcher of Department of Fetal Medicine, SI «Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology of National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kyiv.

УДК 616-006-031-091.8-013.395-018

О. М. Бакурова<sup>1</sup>, Р. В. Бузіна<sup>1</sup>, Р. Б. Кондратюк<sup>1</sup>, Ю. К. Гульков<sup>1,2</sup>, І. В. Василенко<sup>1</sup>, Б. Г. Борзенко<sup>1</sup>

## Тимідинфосфорилаза та можливий зв'язок із формуванням особливостей фенотипу раку легенів

<sup>1</sup>Донецький національний медичний університет ім. М. Горького,<sup>2</sup>Донецьке обласне клінічне територіальне медичне об'єднання**Ключові слова:** тимідинфосфорилаза, неоваскуляризація патологічна, легень новоутворення.

Для таргетної терапії необхідним є визначення особливостей ангиогенезу раку легенів, а отже перспективне застосування його біохімічних маркерів. Тимідинфосфорилазу вважають одним із них. З метою вивчення кореляції між її активністю та індивідуальними особливостями ангиогенезу в 25 пухлинах імуногістохімічним методом визначили судинний маркер ендотелію CD34, спектрофотометричним методом дослідили особливості ферментативної активності. Виявили її підвищення від 30 до 150 нмоль/хв·мг (у 20 пухлинах із 25 у порівнянні з контрольною активністю країв резекції). Встановили прямий кореляційний зв'язок (показник кореляції Спірмена  $\rho = 0,668$ ;  $p < 0,05$ ) між змінами активності та рівнями експресії CD 34, кількістю судин. Це свідчить про можливість застосування тимідинфосфорилази як біохімічного показника ангиогенезу, а також про її взаємозв'язок з індивідуальними особливостями фенотипу раку легенів.

### Тимидинфосфорилаза и возможная связь с формированием особенностей фенотипа рака легких

Е. М. Бакурова, Р. В. Бузина, Р. Б. Кондратиук, Ю. К. Гульков, И. В. Василенко, Б. Г. Борзенко

Для таргетной терапии необходимо определение особенностей ангиогенеза рака легких, а значит, перспективно использование его биохимических маркеров, один из которых – тимидинфосфорилаза. С целью изучения корреляции ферментативной активности с индивидуальными особенностями ангиогенеза в 25 опухолях иммуногистохимическим методом определили сосудистый маркер эндотелия CD34, спектрофотометрическим методом изучили особенности ферментативной активности. Отмечено ее повышение от 30 до 150 нмоль/мин·мг (в 20 опухолях из 25 по сравнению с контрольной активностью краев резекции). Установлена прямая корреляционная связь (показатель корреляции Спирмена  $\rho = 0,668$ ;  $p < 0,05$ ) между изменениями активности и уровнями экспрессии CD 34, количеством сосудов. Это свидетельствует о возможности использования тимидинфосфорилазы в качестве биохимического маркера ангиогенеза, а также о ее взаимосвязи с индивидуальными особенностями фенотипа рака легких.

**Ключевые слова:** тимидинфосфорилаза, ангиогенез, неоваскуляризація патологічна, легких новообразования.**Патология.** – 2015. – №1 (33). – С. 53–55

### Thymidine phosphorylase and its possible correlation with the lung cancer phenotype features

E. M. Bakurova, R. V. Buzina, R. B. Kondratiuk, Yu. K. Gulkov, I. V. Vasilenko, B. G. Borzenko

The tumor phenotype investigation is necessary for lung cancer drug therapy optimization. For this purpose is perspective to use the biochemical markers of angiogenesis. Thymidine phosphorylase may be one of them.

Aim. The aim of study was to evaluate the correlation between the enzyme activity in tumors and the levels of expression of the vascular endothelial marker CD34.

Methods and results. They were examined spectrophotometrically and by the immunohistochemical method, respectively, in 25 samples of lung cancer tissues. It was shown that its activity in tumors is higher as compared to non-neoplastic adjacent tissues (from 30 to 150 nmol/min·mg; in 20 cases from total number). The enzyme activity changes were dependent of the levels of the CD 34, a positive correlation between them was shown (the index of Spearman's rank correlation, i.e.  $\rho = 0,668$ ;  $p < 0,05$ ).

Conclusion. These findings suggest the possibility of using thymidine phosphorylase as a biochemical marker of angiogenesis, its relationship with the lung cancer phenotype features.

**Key words:** Thymidine Phosphorylase, Lung Neoplasms, Neovascularization Pathologic.**Pathologia.** 2015; №1 (33): 53–55

Пухлинний поліморфізм є ознакою злоякісної трансформації, котра суттєво впливає на прогноз, індивідуальну ефективність лікування. Багато в чому фенотипові зміни пухлинної клітини залежать від сигналів мікрооточення, яке безпосередньо має вплив на її геном. Так, деякі білкові молекули є індукторами транскрипції, діють як фактори росту. Поліфункціональний білок тимідинфосфорилаза (ТФ) бере участь у канцерогенезі солідних раків різної локалізації. Це водночас фермент і тромбоцитарний чинник росту ендотеліоцитів (PD-ECGF). Вважають, що йому притаманні ангиогенні, пропроліферативні, антиапоптозні властивості, він пов'язаний із пухлинною прогресією, є одним із критеріїв виживання [1]. Імовірно, ТФ може безпосередньо брати участь у морфогенезі пухлин. У

дослідженні, що здійснили, вивчили особливості активності ТФ і визначили морфологічні індивідуальні особливості ангиогенезу.

#### Мета роботи

Дослідити наявність кореляції між активністю ТФ та індивідуальними особливостями ангиогенезу пухлин легенів

#### Матеріали і методи дослідження

Морфологічні та біохімічні дослідження виконали у 25 пухлинах раку легенів  $T_{3-4}N_xM_0$  стадій (23 випадки – аденокарциноми, 2 – плоскоклітинний рак легенів). Контроль – віддалені від пухлини нетрансформовані тканини країв резекції. Імуногістохімічно визначили специфічний маркер ендотелію судин – CD34. У гістологічних препаратах кількісно визначили кінці зрізів

судин з експресією CD34 у полях зору мікроскопа при збільшенні  $\times 200$  за Г.Г. Автанділовим [2], що є аналогом щільності мікросудин і довжини судинного русла. Малою вважали довжину судинного русла, коли кількість судинних кінців у полі зору була не більше ніж 20, помірно – 21–45, великою – 46–90, дуже великою – понад 90 кінців зрізів судин. Активність ферменту в гомогенатах тканин визначали спектрофотометрично на СФ-46 (Ломо, Російська Федерація) при довжині хвилі 300 нм за змінами оптичної щільності тиміну в 0,01 нNaOH [3]. Вміст білка оцінювали за методом Лоурі [3].

Статистично результати дослідження опрацювали шляхом комп'ютерного аналізу з використанням ліцензійних програм «MedStat» (Альфа) та «Statistica 5.5» (StatSoft). Для перевірки розподілу на нормальність використовували критерій W Шапіро – Уїлка, що дає змогу коректно виконувати перевірку при невеликих обсягах вибірки. При аналізі даних для оцінювання генеральної сукупності використовували стандартні характеристики (обсяг вибірки, середнє значення, стандартна помилка). Порівняли середні значення незалежних вибірок, що підпорядковувались нормальному закону розподілу. Застосовували критерій Стьюдента. Для виявлення статистичного лінійного зв'язку між ознаками використовували методи кореляційного аналізу, розраховували показник рангової кореляції Спірмена. Для встановлення значущості виявленого зв'язку порівняли розрахункове значення з відповідним критичним значенням на рівні значущості  $p=0,05$ .

### Результати та їх обговорення

Зворотна фосфорилазна реакція, що у класичному напрямі є реакцією катаболізму дезокситимідилату, постачає клітинам тимін і дезоксифосфопентозу – 2-дезоксид-рибозу. Ці продукти водночас є стимуляторами ангіогенезу. Протягом індивідуального зіставлення значень активності ТФ у тканинах встановили: активність ТФ у 20 пухлинах із 25 (80%) була вищою, ніж активність у контролі. При цьому індивідуальні значення пухлинної активності у вибірці значно змінювались (від 30 до 150 нмоль/хв·мг).

Під час імуногістохімічного дослідження рівнів експресії судинного маркера ендотелію CD34 у цих пухлинах виявили їх варіативність. При зіставленні цих індивідуальних особливостей із ферментативною активністю встановили пряму кореляцію. Наприклад, низьким рівням експресії CD34 відповідають рівні пухлинної активності ТФ у межах  $35,16 \pm 8,62$  нмоль/хв·мг,  $n=7$ ; помірним –  $77,17 \pm 20,22$  нмоль/хв·мг,  $n=8$  ( $p < 0,01$ ); високим рівням –  $136,24 \pm 25,43$  нмоль/хв·мг,  $n=7$  ( $p < 0,001$ ) відповідно. Підвищення активності ТФ у підгрупах вірогідне. Отже, між змінами активності ТФ і показником ангіогенезу CD34 встановили прямий кореляційний зв'язок (показник кореляції Спірмена  $r = 0,668$ ;  $p < 0,05$ ). Це відповідає результатам інших дослідників: зниження рівня тимідину призводить до промоції проліферації ендотеліоцитів, а 2-дезоксид-рибоза індукує міграцію ендотеліальних клітин при

хемотаксичній відповіді та формування ендотеліальних тяжів у колагеновому гелі [4].

У препаратах підраховували кількість судин, які експресують CD34, що показує індивідуальні особливості ангіогенезу. За значеннями показника вибірку препаратів пухлин поділили на дві підгрупи: перша – з помірною довжиною судинного русла ( $n=9$ ) (рис. 1), друга – з великою довжиною судинного русла ( $n=13$ ) (рис. 2). Зіставляючи особливості активності ТФ у підгрупах 1 та 2, одержали дані, що узгоджуються з кореляцією між активністю й CD34 (рис. 3).

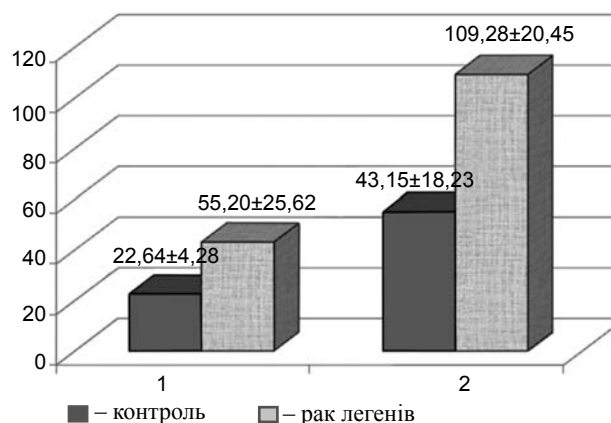


Рис. 3. Зміни активності ТФ залежно від довжини судинного русла пухлин у підгрупах 1 та 2, нмоль/хв·мг.

Так, у підгрупі 2 встановили вірогідне ( $p < 0,01$ ) підвищення пухлинної активності ензиму вдвічі в порівнянні з пухлинами 1 підгрупи (рис. 3), таку саму тенденцію виявили для контролю. Отже, не тільки пухлинна, але й активність ТФ у контролі в підгрупі 2 були вищими. Імовірно, це вказує на універсальність дії сигнальних стимулів у тканинах легенів, які здатні сприймати як нормальні, так і трансформовані тканини.

Опубліковано результати досліджень інших авторів про зв'язок між експресією ТФ і щільністю судин у пухлинах різної локалізації. Важливими є відомості М. Ikeguchi і співавт., які досліджували рак шлунка: максимальну щільність судин мали пухлини, в яких експресування TP відбувалось і в пухлинних клітинах, і в її стромі [5]. Отже, автори виявили активуючий вплив на ангіогенез раку загальної кількості як пухлинних, так і стромальних клітин, що експресують ТФ. Ці дані, а також наші результати роблять припустимим визначення активності ТФ у гомогенатах пухлин, оскільки це може впливати на процеси ангіогенезу, а також надати сумарну інформацію про загальну спрямованість метаболізму тканини.

### Висновки

1. Зміни активності ТФ у гомогенатах пухлин прямо корелюють з індивідуальними показниками ангіогенезу раку легенів (із рівнями експресії судинного маркера ендотелію CD34 і кількістю мікросудин).
2. Активність ензиму можна застосовувати як біохімічний показник, що показує індивідуальні особливості ангіогенезу, а тому має вплив на формування фенотипу раку легень.

### Список літератури

1. Low Thymidylate Synthase, Thymidine Phosphorylase, and Dihydropyrimidine Dehydrogenase mRNA Expression Correlate With Prolonged Survival in Resected Non-Small-Cell Lung Cancer / P.P. Grimminger, P.M. Schneider, R. Metzger et al. // *Clinical Lung Cancer*. – 2010. – Vol. 11. – №5. – P. 328–334.
2. Автандилов Г.Г. Введение в количественную патологическую морфологию / Г.Г. Автандилов. – М. : Медицина, 1980. – 216 с.
3. Activity of thymidilate «salvage pathway» enzymes in human gastric cancer and blood serum: correlation with treatment modalities / B.G. Borzenko, E.M. Bakurova, Yu.A. Popovich, E.A. Sidyuk et al. // *Experimental Oncology* – 2013. – Vol. 35. – №1. – P. 37–40.
4. Suppression of thymidine phosphorylase-mediated angiogenesis and tumor growth by 2-deoxy-L-ribose / H. Uchimiya, T. Furukawa, M. Okamoto et al. // *Cancer Res.* – 2002. – Vol. 62. – №10. – P. 2834–2839.
5. The expression of thymidine phosphorylase and its correlation with angiogenesis in gastric adenocarcinoma / M. Ikeguchi, S. Oka, H. Saito et al. // *Anticancer Res.* – 1999. – Vol. 19. – №5B. – P. 4001–4005.

### References

1. Grimminger, P., Schneider, P., Metzger, R., & Halsor, E. (2010). Low thymidylate synthase, thymidine phosphorylase, and dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA expression correlate with prolonged survival in resected non-small-cell lung cancer. *Clinical Lung Cancer*, 11(5), 328–334.
2. Avtandilov, G. G. (1980). Vvedenie v kolichestvennyuyu patologicheskuyu morfologiyu [*The introduction into the measuring pathological morphology*]. Moscow: Medicina. [in Russian].
3. Borzenko, B. G., Bakurova, E. M., Popovich, Yu. A., Sidyuk, E. A., & Popovich, A. Y. (2013). Activity of thymidilate “salvage pathway” enzymes in human gastric cancer and blood serum: correlation with treatment modalities. *Experimental Oncology*, 35(1), 37–40.
4. Uchimiya, H., Furukawa, T., Okamoto, M., & Tsuchida, A. (2002). Suppression of thymidine phosphorylase-mediated angiogenesis and tumor growth by 2-deoxy-L-ribose. *Cancer Research*, 62(10), 2834–2839.
5. Ikeguchi, M., Oka, S., Saito, H., Yamamoto, S., & Kitadai, Y. (1999). The expression of thymidine phosphorylase and its correlation with angiogenesis in gastric adenocarcinoma. *Cancer Research*, 19(5), 4001–4005.

### Відомості про авторів:

Бакурова О.М. к. мед. н., доцент каф. хімії, Донецький національний медичний університет ім. М. Горького, E-mail: 32023@mail.ru.

Бузина Р.В., асистент каф. патоморфології, Донецький національний медичний університет ім. М. Горького.

Кондратюк Р.Б., к. мед. н., доцент каф. патоморфології, Донецький національний медичний університет ім. М. Горького.

Гульков Ю.К., к. мед. н., доцент каф. патоморфології, Донецький національний медичний університет ім. М. Горького,

зав. бюро патоморфології, Донецьке обласне клінічне територіальне медичне об'єднання.

Василенко І.В., д. мед. н., професор, зав. каф. патоморфології, Донецький національний медичний університет ім. М. Горького.

Борзенко Б.Г., д. біол. н., професор каф. хімії, Донецький національний медичний університет ім. М. Горького.

### Сведения об авторах:

Бакурова Е.М., к. мед. н., доцент каф. химии, Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького, E-mail: 32023@mail.ru.

Бузина Р.В., ассистент каф. патоморфологии, Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького.

Кондратиук Р.Б., к. мед. н., доц. каф. патоморфологии, Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького.

Гульков Ю.К., к. мед. н., доцент каф. патоморфологии, Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького,

зав. бюро патоморфологии, Донецкое областное клиническое территориальное медицинское объединение.

Василенко И.В., д. мед. н., профессор, зав. каф. патоморфологии, Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького.

Борзенко Б.Г., д. биол. н., профессор каф. химии, Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького.

### Information about authors:

Bakurova E.M., as. of professor of chemistry department, M. Gorky Donetsk National Medical University, E-mail: 32023@mail.ru.

Buzina R.V., as. of professor of pathomorphology department, DonNMU; M. Gorky Donetsk National Medical University.

Kondratiyuk R.B., as. of professor of pathomorphology department, M. Gorky Donetsk National Medical University.

Gulkov Yu.K., as. of professor of pathomorphology department, M. Gorky Donetsk National Medical University.

Vasilenko I.V., prof., chief of pathomorphology department, M. Gorky Donetsk National Medical University.

Borzenko B.G., prof., prof. of chemistry department, M. Gorky Donetsk National Medical University.

Надійшла в редакцію 15.01.2015 р.

УДК 616.71-007.235-085

В. В. Григоровский, А. Н. Зима, Ю. Н. Гук, С. Магомедов, О. Г. Гайко, Т. А. Кинчая-Полищук

## Статистические характеристики и корреляции гистоморфометрических, клинических и биохимических показателей при системной терапии у больных несовершенным остеогенезом

ГУ «Институт травматологии и ортопедии Национальной АМН Украины», г. Киев

**Ключевые слова:** несовершенный остеогенез, терапия лекарственная, гистоморфометрия спонгиоза, денситометрия, биохимия, корреляции, памидронат.

Ранее у больных несовершенным остеогенезом не проводили анализ корреляционных связей между различными показателями состояния костной ткани. С целью установить различия и корреляционные зависимости показателей до и после проведения курсов системной терапии памидроном у 13 больных изучали биоптаты костных фрагментов крыла подвздошной кости; определяли гистоморфометрические показатели. Установлены параметры корреляции биохимических и гистоморфометрических показателей. После системной терапии средние параметры костного объема или биоптатов нарастают, а остеонной поверхности и остеокластического индекса на единицу поверхности у больных несовершенным остеогенезом I типа снижаются, что следует расценивать как тенденцию к улучшению структурно-функционального состояния костной ткани.

### Статистичні характеристики та кореляції гистоморфометричних, клінічних і біохімічних показників за системної терапії у хворих на недосконалий остеогенез

В. В. Григоровський, А. М. Зима, Ю. М. Гук, С. Магомедов, О. Г. Гайко, Т. А. Кінча-Полищук

Раніше у хворих на недосконалий остеогенез не здійснювали аналіз кореляційних зв'язків між різними показниками стану кісткової тканини. З метою встановити відмінності та кореляційні залежності показників до і після проведення курсів системної терапії памідроном у 13 хворих вивчали біоптати кісткових фрагментів крила клубової кістки; визначали гистоморфометричні показники. Встановили параметри кореляції біохімічних і гистоморфометричних показників. Після системної терапії середні параметри кісткового об'єму в іліобіоптатах нарастають, а остеонної поверхні й остеокластичного індексу на одиницю поверхні у хворих на недосконалий остеогенез I типу знижуються, що слід вважати тенденцією до поліпшення структурно-функціонального стану кісткової тканини.

**Ключові слова:** недосконалий остеогенез, терапія, гистоморфометрія спонгіозу, денситометрія, біохімія, памідронат.

**Патологія.** – 2015. – №1 (33). – С. 56–64

### Statistical characteristics and correlations of histomorphometric, clinical and biochemical indices in systemic therapy in patients with osteogenesis imperfecta

V. V. Hryhorovskiy, A. M. Zyma, Yu. M. Guk, S. Mahomedov, O. G. Gayko, T. A. Kintchaia-Polishchuk

Actuality. The correlation analysis between various indices of bone tissue condition was not previously carried out in patients with osteogenesis imperfecta.

Aim. On purpose to determine differences and index correlations before and after intake of pamidronate systemic therapy in 13 patients with osteogenesis imperfecta indices of some methods including histomorphometric were studied.

Results. We found correlation parameters of biochemical indices, on one side and histomorphometric – on the other.

Conclusion. After systemic therapy mean parameters of «bone volume» in iliobiopsies increase, and «osteoid surface» and «osteoclast index per surface unit» in patients with osteogenesis imperfecta of I type – decrease, that one can regard as a tendency to improvement of the bone tissue structural-functional condition.

**Key words:** Osteogenesis Imperfecta, Drug Therapy, Densitometry, Biochemistry, Pamidronate.

**Pathologia.** 2015; №1 (33): 56–64

Несовершенный остеогенез (НО) – группа аутосом-но-доминантных, наследственных заболеваний соединительной ткани, вызванных мутациями генов коллагена I типа, при которых поражаются кости скелета, суставы, ткани органа слуха, связки, зубы, склеры и кожа [7,8]. В общем виде НО определяют как генетически детерминированное заболевание соединительной ткани, характеризующееся ломкостью костей. Заболевание включает фенотипически и генотипически гетерогенную группу расстройств, возникающих в результате мутаций в генах, кодирующих коллаген I типа. Особенности патологии костной ткани у больных НО описаны во многих работах, в основном на аутопсийных случаях,

фрагментах резецированной костной ткани или тканях конечностей, ампутированных по соответствующим показаниям [1,4–6].

Ряд исследований посвящен изучению гистоморфометрических показателей губчатой костной ткани, спонгиоза (ГМС) и кортекса или биоптатов у больных НО [3,9]. Так, у детей от 1,5 до 13,5 лет с НО I, III и IV типов при изучении статических и динамических показателей ГМС в илибиоптатах после лечения тетрациклиновыми препаратами установлено снижение параметров показателей объема губчатой кости, числа трабекул на 41–57 % и толщины трабекул на 15–27% в сравнении с возрастной нормой [10].

© В. В. Григоровский, А. Н. Зима, Ю. Н. Гук, С. Магомедов, О. Г. Гайко, Т. А. Кинчая-Полищук, 2015



Лечение больных НО представляет собой комплексную задачу: хирургические вмешательства, направленные на достижение сращения кости на месте перелома с предотвращением повторных переломов, выполняются на фоне периодического проведения курсов системной терапии антирезорбентами, назначаемыми для улучшения прочностных свойств костной ткани всего скелета [6,8–10]. Контроль динамики структурно-функциональных свойств костной ткани больных НО в процессе системной терапии предполагает применение ряда методов оценки: клинических, dual-energy X-ray absorptiometry (DXA-денситометрических), биохимических, гистоморфометрии спонгиозы [4–6,8]. В некоторых исследованиях тестовыми объектами перед началом системной терапии, в процессе и после ее окончания являются илибиоптаты, в которых проводят ГМС по ряду показателей [3,9,10]. Однако в этих исследованиях не изучали динамику некоторых новейших биохимических маркеров обмена костной ткани и не проводили анализ корреляционных связей между различными показателями, отражающими состояние костной ткани, что позволило бы объективно оценить степень их информативности.

#### Цель работы

На основании изучения достоверности различий групповых средних параметров, а также корреляционных зависимостей клинических, DXA-денситометрических, биохимических и ГМС-показателей спонгиозы илибиоптатов установить эффект проведения курсов лечения памидроном и информативность некоторых методов оценки состояния губчатой костной ткани у больных НО.

#### Материалы и методы исследования

Материалом исследования послужили биоптаты костных фрагментов крыла подвздошной кости (илибиоптаты) от 13 больных НО (3 – I типа, 10 – III типа), разного пола в возрасте от 5 до 17 лет, которым по показаниям выполняли операции на различных костях скелета. Группу сравнения для показателей ГМС составили лица, которые погибли вследствие острой травмы или умерли от острых непродолжительных заболеваний: автотравмы, кататравмы, механической асфиксии, острого смертельного отравления, острой лейкемии, плевропневмонии, менингоэнцефалита и т.п., т.е. условно здоровые – всего 15 случаев [2].

Тип НО устанавливали на основании клинического и биохимического исследований. Учитывали количество переломов до начала лечения памидроном. При DXA-денситометрии учитывали значения Z-критерия при исследовании плотности костной ткани тел поясничных позвонков [4].

Системная терапия включала применение препаратов кальция (500–800 мг/сут), активных форм витамина D (0,25–1,00 мкг/сут) и памидроновой кислоты в дозе 0,5–1,0 мг/кг/сут (при условии данных уровня кальция крови не ниже 2,4 ммоль/л). Медикаментозную терапию проводили в 3–4 цикла с интервалом 3 месяца.

Метаболизм костной ткани изучали согласно рекомендациям Международной организации остеопороза

(International Osteoporosis Foundation). Из биохимических показателей сыворотки крови определяли параметры костной щелочной фосфатазы (ЩФ, мкат/л), остеокальцина крови (показатель скорости ремоделирования, нг/мл), концентрации пептидов P1NP (показатель костеобразования, нг/мл) и  $\beta$ -CrossLabs (показатель костной резорбции, нг/мл) [5]. Маркеры ремоделирования костной ткани определяли хемиллюминесцентным методом на анализаторе Eleksys 2010 фирмы Roche Diagnostics с использованием тест-систем Cobas. Активность ЩФ в сыворотке крови у больных НО определяли по методу А. Бодански.

Параметры ГМС в каждом случае измеряли до получения других показателей, т.е. применяя «слепой» метод. ГМС илибиоптатов включала определение таких показателей из системы ASBMR (American Society for Bone and Mineral Research, USA) [2,3,9,10]: костный объем спонгиозы – bone volume/total volume (BV/TV%); остеонидная поверхность – osteoid surface/bone surface (OS/BS%); остеокластический индекс на единицу площади (удельное количество многоядерных остеокластов на единицу площади измерения) – number osteoclasts/total area (N.Ос/Т.Ар 1/мм<sup>2</sup>); остеокластический индекс на единицу поверхности (удельное количество многоядерных остеокластов на единицу пересечения поверхности костных перекладин) – number osteoclasts/bone surface (N.Ос/BS 1/мм).

Статистические расчеты выполнили на программируемом калькуляторе и в среде программы Statistica, v. 6.0 фирмы StatSoft Inc.

#### Результаты и их обсуждение

*DXA-показатель до и после терапии у больных НО (табл. 1).* Средние значения Z-критерия как в подгруппе нелеченных, так и в подгруппе леченных больных при НО III типа были выше, чем в группе больных НО I типа. Средние параметры этого показателя в обеих группах больных с разным типом НО после лечения памидроном увеличивались. Результаты всех статистических сравнений оказались недостоверны при имеющемся числе наблюдений.

*Биохимические показатели до и после системной терапии у больных НО (табл. 1).* Средние значения уровня ЩФ крови до применения терапии у больных с разным типом НО (I, III) были практически одинаковы; после проведения курсов терапии памидроном у больных НО I типа этот показатель увеличивался незначительно, а в группе больных НО III типа снижался более чем в 2 раза (недостоверно). Средние значения уровня остеокальцина крови до лечения у больных НО III типа были заметно ниже, чем у больных НО I типа; после лечения уровень у больных НО I типа достоверно снижался, а у больных НО III типа несколько нарастал (недостоверно). Межгрупповые сравнения средних параметров у больных с разным типом НО до и после лечения не обнаружили достоверных различий. Средние значения уровня P1NP в сыворотке крови у больных НО III типа как в подгруппах нелеченных, так и в подгруппах леченных были заметно

Таблица 1

**Средние параметры и статистический анализ различий DXA-, биохимических и гистоморфометрических показателей в группах и подгруппах больных несовершенным остеогенезом**

Показатель, единицы измерения	Характеристика градаций и некоторые статистические данные	Средние частотные и мерные параметры у больных различными типами НО			
		Группа больных НО I типа		Группа больных НО III типа	
		подгруппа нелеченные	подгруппа леченные	подгруппа нелеченные	подгруппа леченные
<b>DXA-показатель</b>					
Z-критерий	Число случаев n, средняя, ошибка средней X±SE	n=2 2,60±1,00	n=1 4,30±0,00	n=4 4,78±0,88	n=2 5,55±1,25
	Сравнение параметров в группах	k=4 t=1,498 НД			
	Сравнение параметров в подгруппах	k=1 t=0,981 НД		k=1 t=0,577 НД	
<b>Биохимические показатели</b>					
Щелочная фосфатаза крови, мккат/л	Число случаев n, средняя, ошибка средней X±SE	n=1 3,27±0,00	n=1 3,36±0,00	n=2 3,25±1,81	n=4 1,60±0,31
	Сравнение параметров в группах	k=1 t=0,0064 НД			
	Сравнение параметров в подгруппах	k=0 t=0 НД		k=3 t=2,539 p<0,1	
Остеокальцин крови, нг/мл	Число случаев n, средняя, ошибка средней X±SE	n=1 111,1±0,0	n=2 43,76±1,56	n=4 71,86±7,39	n=6 80,01±25,88
	Сравнение параметров в группах	k=3 t=2,375 p<0,1			
	Сравнение параметров в подгруппах	k=1 t=24,92 p<0,05		k=6 t=0,767 НД	
P1NP, нг/мл	Число случаев n, средняя, ошибка средней X±SE	n=1 214,70±0,00	n=1 202,1±0,00	n=3 363,1±103,97	n=5 411,56±203,34
	Сравнение параметров в группах	k=2 t=0,714 НД			
	Сравнение параметров в подгруппах	k=0 t=0 НД		k=4 t=0,421 НД	
β-CrossLaps, нг/мл	Число случаев n, средняя, ошибка средней X±SE	n=1 0,688±0,00	n=1 0,401±0,00	n=3 0,872±0,092	n=5 0,786±0,197
	Сравнение параметров в группах	k=2 t=1,00 НД			
	Сравнение параметров в подгруппах	k=0 t=0 НД		k=6 t=0,172 НД	
<b>Гистоморфометрические показатели</b>					
Костный объем, %	Число полей измерения n*, средняя, ошибка средней X±SE	n=7 28,95±4,07	n=5 42,99±10,16	n=19 14,39±2,32	n=36 21,69±1,56
	Сравнение параметров в группах	k=24 t=3,203 p<0,01			
	Сравнение параметров в подгруппах	k=10 t=1,443 НД		k=39 t=3,891 p<0,001	
Остеоидная поверхность, %	Число полей измерения n*, средняя, ошибка средней X±SE	n=26 29,58±1,08	n=37 17,30±0,23	n=80 29,75±1,09	n=160 29,66±1,06
	Сравнение параметров в группах	k=104 t=0,0845 НД			
	Сравнение параметров в подгруппах	k=61 t=13,02 p<0,001		k=195 t=5,589 p<0,001	
Остеокластический индекс (количество остеокластов на единицу площади среза), 1/кв. мм	Число полей измерения n*, средняя, ошибка средней X±SE	n=26 3,41±0,30	n=37 4,30±0,53	n=80 2,94±0,267	n=160 2,89±0,107
	Сравнение параметров в группах	k=104 t=0,941 НД			
	Сравнение параметров в подгруппах	k=61 t=1,306 НД		k=238 t=0,207 НД	
Остеокластический индекс (количество остеокластов на единицу пересечений поверхности трабекул), 1/мм	Число полей измерения n*, средняя, ошибка средней X±SE	n=26 1,155±0,031	n=37 0,936±0,081	n=80 0,865±0,024	n=160 1,246±0,051
	Сравнение параметров в группах	k=104 t=6,344 p<0,001			
	Сравнение параметров в подгруппах	k=61 t=2,184 p<0,05		k=195 t=3,593 p<0,001	

Примечания: k – число степеней свободы:  $n_1+n_2-2$ ; t – фактическое значение критерия Стьюдента; p – вероятность ошибки при оценке разницы средних параметров; \* – при расчете параметров ГМС-показателей; n – число обработанных полей зрения микроскопа, в которых проводили измерения; НД – различия средних величин недостоверны при имеющемся количестве наблюдений ( $p>0,1$ ).

выше, чем у больных НО I типа; после лечения памидроном этот показатель у больных НО I типа несколько снижался, а у больных НО III типа – нарастал (недостаточно при имеющемся числе наблюдений). Средние значения уровня  $\beta$ -CrossLaps в крови у больных НО III типа как в подгруппах нелеченных, так и в подгруппах леченных были заметно выше, чем у больных НО I типа. После лечения памидроном в обеих группах (НО I и III типа) показатель снижался, однако более заметным было снижение у больного НО I типа (недостаточно).

**Гистологические свойства спонгиозы в илибиоптатах.** Трабекулы спонгиозы формировали более или менее связанную сетчатую структуру, сами перекладины имели различную толщину (рис. 1, 2). В толще перекладин содержались небольших размеров вставочные структуры, не полностью подвергшиеся резорбции во время предыдущей перестройки спонгиозы, или участ-

ки ретикулофиброзной костной ткани. Костная ткань перекладин характеризовалась гиперцеллюлярностью остецитов, характерной для костной ткани больных НО. На поверхности перекладин во многих местах отмечены наслоения остеоида (рис. 3) с однослойными скоплениями кубовидных или уплощенных остеобластов с признаками различной функциональной активности. В спонгиозе биоптатов некоторых больных на поверхностях трабекул кое-где наблюдали очень тонкие и короткие наслоения неминерализованного остеоида (рис. 4). В разных местах поверхности трабекул спонгиозы в небольших углублениях (эрозийные лакуны), а иногда без таких располагались многоядерные гигантские клетки с плотной цитоплазмой и неровным контуром – остеокласты (рис. 5). В некоторых случаях суммарное количество остеокластов в совокупной площади полей подсчета было низким (рис. 6).

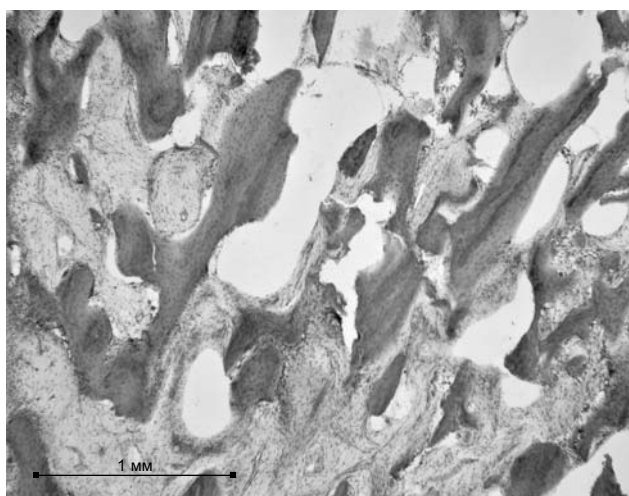


Рис. 1. Спонгиоза подвздошной кости с большим количеством костных перекладин и высоким параметром костного объема (BV/TV %). Гистопрепарат илибиоптата 6-ного НО III типа, 8 лет. Окрашивание гематоксилином и эозином, увеличение 30 х.

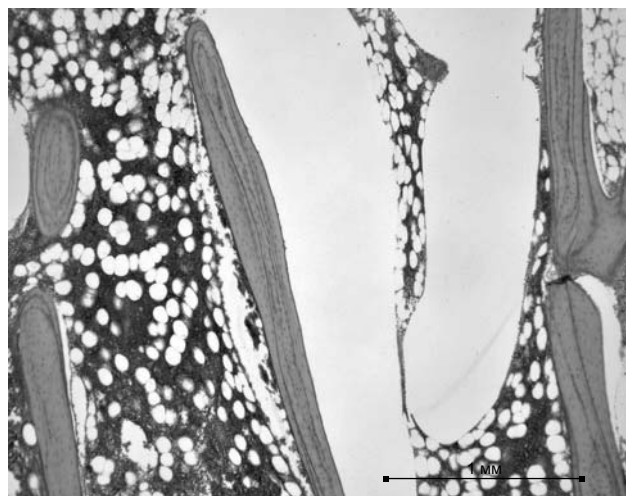


Рис. 2. Спонгиоза подвздошной кости с малым количеством костных перекладин и низким параметром костного объема (BV/TV %). Гистопрепарат илибиоптата 6-ного НО III типа, 12 лет. Окрашивание гематоксилином и эозином, увеличение 30 х.

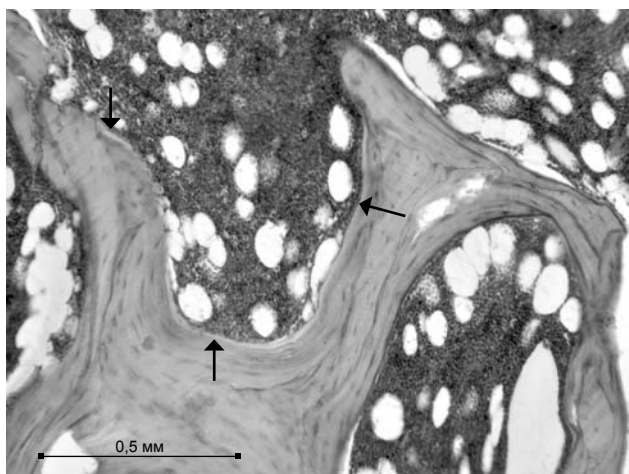


Рис. 3. Спонгиоза подвздошной кости с хорошо выраженной «остеоидной поверхностью» (OS/BS %). Полоски остеоида на поверхностях трабекул указаны стрелками. Гистопрепарат илибиоптата 6-ного НО III типа, 17 лет. Окрашивание гематоксилином и эозином, увеличение 75 х.

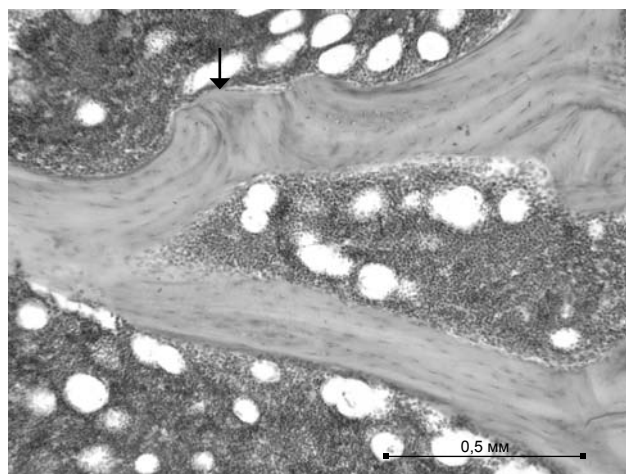


Рис. 4. Спонгиоза подвздошной кости со слабо выраженной «остеоидной поверхностью» (OS/BS %). Полоски остеоида на поверхностях трабекул указаны стрелками. Гистопрепарат илибиоптата 6-ного НО III типа, 15 лет. Окрашивание гематоксилином и эозином, увеличение 75 х.

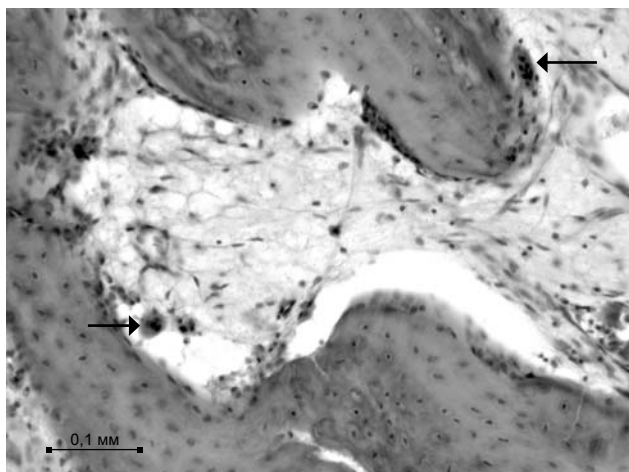


Рис. 5. Спонгиоза подвздошной кости с высоким параметром остеокластического индекса на единицу площади (N.Ос/Т.Ар) и большим количеством остеокластов (указаны стрелками) на поверхности трабекул. Гистопрепарат илиобиоптата б-ного НО III типа, 8 лет. Окрашивание гематоксилином и эозином, увеличение 150 х.

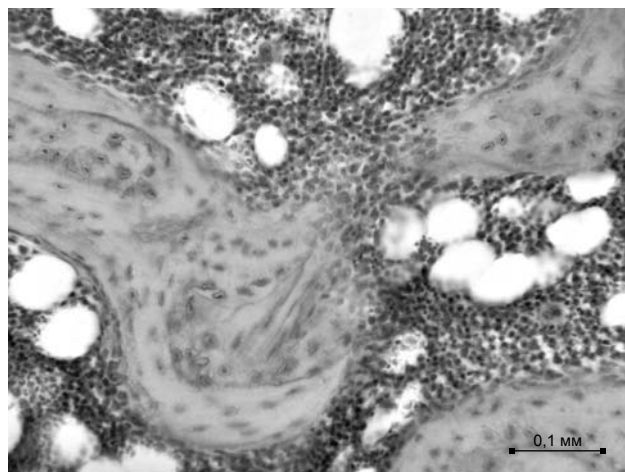


Рис. 6. Спонгиоза подвздошной кости с низким параметром остеокластического индекса (N.Ос/Т.Ар); остеокласты на поверхности трабекул отсутствуют. Гистопрепарат илиобиоптата б-ного НО III типа, 9 лет. Окрашивание гематоксилином и эозином, увеличение 150 х.

*Гистоморфометрические показатели спонгиозы (табл. 1).* Средние значения костного объема у больных НО III типа в 2 раза ниже, чем у пациентов с НО I типа (различия статистически достоверны). После применения курсов лечения памидронатом этот показатель в обеих группах сравнения увеличивается примерно в 1,5 раза (различия статистически достоверны в группе больных НО III типа).

Если средние значения остеонной поверхности у больных обеих групп сравнения до лечения были почти одинаковы, то после применения курсов системной терапии памидронатом в группе больных НО I типа средний параметр достоверно снизился, а у больных НО III типа практически не изменился. Различия средних величин этого показателя после терапии в группах сравнения статистически достоверны.

Среднее значение остеокластического индекса на единицу площади в группе больных НО I типа как до, так и после лечения несколько выше, чем у больных НО III типа; при сравнении параметров в подгруппах леченных различия достоверны.

Среднее значение остеокластического индекса на единицу поверхности в группе больных НО I типа до лечения памидронатом достоверно выше, чем у больных НО III типа, после лечения средний параметр этого показателя в группе больных НО I типа достоверно снизился, а в группе больных НО III типа достоверно повысился.

*Корреляции между отдельными показателями у больных НО (табл. 2).* Из всех корреляционных пар с участием градиционного клинического показателя числа переломов уровень ЩФ обнаруживал связь наибольшей тесноты (абсолютное значение параметра близко к 0,4, недостоверно при имеющемся числе наблюдений). Во всех других корреляционных парах «показатель числа переломов и денситометрические, биохимические и ГМС-показатели» значения коэффициента ассоциации соответствовали диапазону очень слабой связи.

ДХА-показатель Z-критерий по абсолютному значению обнаруживал наибольший параметр коэффициента корреляции с ГМС-показателем костного объема, параметр соответствовал обратной зависимости, приближающейся к диапазону значений корреляции средней силы. С другими ГМС-показателями параметры корреляции Z-критерия соответствовали диапазону слабой или очень слабой связи.

Параметры коэффициента корреляции биохимических показателей уровня ЩФ и остеокальцина крови, а также ГМС-показателей соответствовали диапазону очень слабой связи. Параметры коэффициента корреляции показателей уровня пептидов P1NP и  $\beta$ -CrossLaps, а также ГМС-показателей (костный объем и остеокластические индексы) обнаруживали зависимости с абсолютными значениями в диапазоне 0,3–0,5, все зависимости отрицательные, недостоверные при имеющемся числе наблюдений.

В предыдущей работе, посвященной исследованию данных ДХА-денситометрии (Z-критерия) в оценке структурно-функционального состояния костной ткани у больных НО, установлено: у больных НО I и III типов наблюдают снижение минеральной плотности костной ткани при оценке по Z-критерию от -1,9 до -7,4 SD, абсолютные параметры этого показателя у больных НО III типа достоверно выше как для тел поясничных позвонков, так и для проксимального отдела бедра. Установлена также корреляционная зависимость большой или средней силы между количеством переломов в анамнезе больного НО и Z-критерием [4]. В нашем исследовании связь между этими показателями соответствовала параметру очень слабых значений.

В ряде исследований подчеркивается важная роль определения параметров биохимических показателей для оценки состояния метаболизма костной ткани у больных НО [5,6,8]. Современные исследователи при-

**Корреляционные зависимости между клиническими, DXA-денситометрическими, биохимическими и гистоморфометрическими показателями больных несомненным остеогенезом**

Первый показатель	Второй показатель	n, число учтенных случаев с параметрами обоих показателей	Значения коэффициента корреляции и критерии достоверности его параметров		
			Значения ко- эффициента корреляции r	t-критерий Стьюдента- фактическое значение	Вероятность ошибки при оценке параметра r
<b>Корреляция «клиника – DXA-показатель»</b>					
Число переломов до операции, во время которой получена или биопсия. Градации: низкая степень – в анамнезе до 10 переломов включительно, высокая – более 10 переломов.	Z-критерий, абсолютное значение показателя	9	+0,146	0,391	0,708
<b>Корреляции «клиника – биохимия»</b>					
Число переломов	Щелочная фосфатаза	<b>8</b>	<b>-0,392</b>	<b>1,044</b>	<b>0,337</b>
	Остеокальцин	13	+0,100	0,333	0,745
	P1NP	10	+0,059	0,167	0,872
	$\beta$ -CrossLaps	10	+0,261	0,765	0,466
<b>Корреляции «клиника – гистоморфометрия»</b>					
Число переломов	Костный объем	<b>16</b>	<b>-0,294</b>	<b>1,150</b>	<b>0,269</b>
	Остеоидная поверхность	16	+0,275	1,069	0,303
	Остеокластический индекс на единицу площади	16	-0,166	0,629	0,540
	Остеокластический индекс на единицу поверхности	<b>16</b>	<b>+0,133</b>	<b>0,502</b>	<b>0,623</b>
<b>Корреляции «DXA-денситометрия – гистоморфометрия»</b>					
Z-критерий, абсолютное значение показателя	Костный объем	9	-0,498	1,518	0,173
	Остеоидная поверхность	9	-0,081	0,214	0,837
	Остеокластический индекс на единицу площади	9	-0,254	0,696	0,509
	Остеокластический индекс на единицу поверхности	9	+0,317	0,884	0,406
<b>Корреляции «биохимия – гистоморфометрия»</b>					
Щелочная фосфатаза	Костный объем	8	-0,084	0,206	0,844
	Остеоидная поверхность	8	-0,060	0,147	0,888
	Остеокластический индекс на единицу площади	8	+0,087	0,213	0,838
	Остеокластический индекс на единицу поверхности	8	+0,002	0,005	0,997
Остеокальцин	Костный объем	13	+0,045	0,148	0,885
	Остеоидная поверхность	13	-0,093	0,310	0,762
	Остеокластический индекс на единицу площади	13	+0,021	0,071	0,945
	Остеокластический индекс на единицу поверхности	13	+0,247	0,845	0,416
P1NP	Костный объем	<b>10</b>	<b>-0,451</b>	<b>1,429</b>	<b>0,191</b>
	Остеоидная поверхность	10	-0,092	0,260	0,801
	Остеокластический индекс на единицу площади	<b>10</b>	<b>-0,386</b>	<b>1,185</b>	<b>0,270</b>
	Остеокластический индекс на единицу поверхности	<b>10</b>	<b>-0,317</b>	<b>0,949</b>	<b>0,371</b>
$\beta$ -CrossLaps	Костный объем	<b>10</b>	<b>-0,350</b>	<b>1,055</b>	<b>0,322</b>
	Остеоидная поверхность	10	-0,216	0,626	0,549
	Остеокластический индекс на единицу площади	<b>10</b>	<b>-0,368</b>	<b>1,119</b>	<b>0,296</b>
	Остеокластический индекс на единицу поверхности	<b>10</b>	<b>-0,477</b>	<b>1,534</b>	<b>0,164</b>

Примечание: выделены пары показателей, коррелирующие с абсолютным значением коэффициента  $>0,3$ .

дают решающее значение комплексу биохимических показателей с использованием маркеров IV поколения, отражающих отдельные стороны процессов ремоделирования костной ткани:

- пропептида проколлагена I типа (P1NP) – маркера костеобразования; диапазон нормативных значений – 20–100 нг/мл;
- пропептида  $\beta$ -CrossLaps или  $\beta$ -СТх – маркера остеорезорбции; диапазон нормативных значений – <0,573 нг/мл;
- остеокальцина – неколлагенового белка матрикса костной ткани, являющегося средством оценки скорости ремоделирования с диапазоном нормативных значений 11–43 нг/мл.

У всех больных НО I и III типов индивидуальные параметры уровня P1NP,  $\beta$ -CrossLaps и остеокальцина сыворотки (кроме одного больного НО III типа) были выше верхней границы нормативных значений [5].

В настоящем исследовании параметры P1NP превышали верхнюю границу нормативных значений у 9 больных НО из 10; параметры  $\beta$ -CrossLaps – у 7 из 10; параметры уровня остеокальцина – у 10 из 13 пациентов.

Предыдущие исследования нарушений процессов ремоделирования костной ткани у больных НО разных типов установили, что показатели, отражающие структурно-функциональные свойства костной ткани, у больных НО количественно отличаются от параметров нормы [2,3,9,10]. В большей мере это касается старшей возрастной подгруппы больных НО (более 10 лет), где средние параметры таких ГМС-показателей, как костный объем спонгиозы и остеоидная поверхность оказываются значительно сниженными по сравнению с возрастной нормой. Показатель, который отражает активность процесса остеорезорбции костной ткани, т. е. остеокластический индекс, обнаруживает повышенные средние параметры в обеих возрастных подгруппах по сравнению с параметрами в группе условно здоровых лиц.

По результатам ГМС-исследований у больных НО установлены средние параметры целого ряда ГМС-показателей [9,10] (табл. 2). Сравнение средних параметров ГМС-показателей, полученных в наших работах и исследованиях зарубежных авторов, свидетельствуют как о сходных тенденциях возрастной динамики этих показателей, так и о некоторых различиях. Так, по нашим данным, у условно здоровых лиц с увеличением возраста средние параметры таких показателей, как костный объем и остеоидная поверхность возрастают, а остеокластического индекса – снижаются. Средние значения интегрального показателя костного объема у больных НО младшей возрастной подгруппы оказались ниже (статистически недостоверно) по сравнению с группой условно здоровых, хотя средний возраст больных НО этой подгруппы был выше, чем в подгруппе условно здоровых. В старших возрастных подгруппах, которые по показателю среднего возраста почти идентичны, средний параметр костного объема у больных НО оказался достоверно ниже, чем параметр подгруппы условно здоровых [2].

Некоторое повышение абсолютных значений Z-критерия у больных НО обоих типов после системной терапии памидронатом представляется парадоксальным и, вероятно, связано с очень малым количеством случаев в группах сравнения.

По данным определения уровня ЩФ, у больных НО III типа после лечения установлено снижение, что подтверждается данными, полученными в исследовании [10]; а также остеокальцина в группе больных НО I типа – до верхней границы нормативных значений показателей. Показатели P1NP изменялись разнонаправленно у больных НО разного типа, а параметры  $\beta$ -CrossLaps снижались в обеих группах, но более выражено у больного НО I типа; все различия недостоверны при имеющемся числе наблюдений.

ГМС-показатели, вероятно, наиболее объективно отражают структурно-функциональные изменения после терапии памидронатом. Так, параметры интегрального показателя костного объема увеличились в 1,5 раза в обеих группах больных НО I и III типов (достоверно у пациентов с НО III типа), что совпадает с тенденцией, установленной другими авторами [9,10], которые обнаружили почти двукратное увеличение среднего параметра этого показателя у леченных больных. Параметры остеоидной поверхности после лечения памидронатом достоверно снижались у больных НО I типа, незначительно – у больных НО III типа, что также согласуется с данными авторов [9,10].

Изучение ГМС-показателей, которые характеризуют состояние остеорезорбции, дало неоднозначные результаты. По нашему мнению, более объективным является остеокластический индекс на единицу поверхности, так как при подсчете числа остеокластов в единице площади на результат может влиять вариация количества трабекул, происходящая в процессе лечения. Средний параметр остеокластического индекса на единицу поверхности у больных НО I типа после лечения снижался, а у больных III типа повышался. Подобный, казалось бы, парадоксальный факт отметили и другие исследователи, что объясняется высокой степенью вариации остеокластического индекса на единицу поверхности, а также возможностью торможения памидронатом резорбирующей функции остеокластов без уменьшения их числа [9]. В другой работе той же группы авторов при измерении параметров относительной остеокластической поверхности (OcS/BS%) в 3 или биоптатах (до лечения, спустя 2–4 года и более 4 лет после начала лечения памидронатом) обнаружено постепенное снижение средних параметров [10].

Мы провели корреляционный анализ ряда показателей, обычно применяемых для характеристики структурно-функционального состояния костной ткани при обследовании больных НО, что позволяет установить их сопряженность с ГМС-показателями и реально оценить информативность в отношении тех или иных особенностей гистоструктуры костной ткани. Связи с наибольшими абсолютными значениями параметров

(все значения недостоверны при имеющемся числе наблюдений) должны быть учтены при прогнозировании состояния костной ткани по результатам DXA и биохимических исследований (табл. 2):

- Z-критерий – костный объем (BV/TV) – связь отрицательная;
- Z-критерий – остеокластический индекс на единицу поверхности (N.Ос/BS) – связь положительная;
- P1NP – костный объем (BV/TV) – связь отрицательная;
- P1NP – остеокластический индекс на единицу площади (N.Ос/Т.Аг) – связь отрицательная;
- P1NP – остеокластический индекс на единицу поверхности (N.Ос/BS) – связь отрицательная;
- $\beta$ -CrossLaps – костный объем (BV/TV) – связь отрицательная;
- $\beta$ -CrossLaps – остеокластический индекс на единицу площади (N.Ос/Т.Аг) – связь отрицательная;
- $\beta$ -CrossLaps – остеокластический индекс на единицу поверхности (N.Ос/BS) – связь отрицательная.

#### Выводы

Наряду с DXA и биохимическими методами контроля, ГМС – наиболее объективный метод оценки структурно-функционального состояния губчатой костной

ткани в норме и при патологии, который дает ценную информацию об интегральной плотности спонгиозы в единице объема, активности процессов остеогенеза и остеорезорбции.

Средние параметры биохимических показателей состояния метаболизма костной ткани у больных НО I и III типов, особенно относящиеся к IV поколению (P1NP,  $\beta$ -CrossLaps), в процессе лечения памидроном в большинстве групп сравнения показывают тенденцию к нормализации.

По результатам гистоморфометрического исследования илиобиоптатов у больных НО разных типов (I, III) установлены различия средних параметров в отдельных группах, а также в подгруппах нелеченных больных и пациентов, получавших системную терапию памидроном.

По данным изучения ГМС-показателей илиобиоптатов установлено: после проведения курсов лечения памидроном у больных НО I и III типов средние параметры костного объема нарастают, а остеонидной поверхности и остеокластического индекса на единицу поверхности у больных НО I типа снижаются, что следует расценивать как тенденцию к улучшению структурно-функционального состояния системной костной ткани.

#### Список литературы

1. Григоровский В.В. Клинико-морфологические особенности поражения костей у больных несовершенным остеогенезом / В.В. Григоровский, Ю.Н. Гук, С. Магомедов и др. // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2010. – №1. – С. 46–54.
2. Григоровський В.В. Гістологія та гістоморфометрія спонгійозу тазової кістки дітей та підлітків у нормі, при нейрофіброматозі I типу та інших захворюваннях / В.В. Григоровський, Ю.М. Гук, Т.А. Кінчає-Поліщук та ін. // Журнал АМН України. – 2005. – №3. – С. 525–539.
3. Григоровський В.В. Патогістологічні властивості та гістоморфометричні характеристики губчастої кісткової тканини в іліобіоптатах від хворих на недосконалий остеогенез / В.В. Григоровський, А.М. Зима // Патологія. – 2013. – №1(27). – С. 71–76.
4. Гук Ю.М. Рентгенівська денситометрія в оцінці структурно-функціонального стану кісткової тканини в пацієнтів із недосконалим остеогенезом / Ю.М. Гук, О.Г. Гайко, А.М. Зима та ін. // Боль. Суставы. Позвоночник. – 2014. – №1–2(13–14). – С. 42–46.
5. Кризь-Пугач А.П. Метаболізм кісткової тканини у хворих на недосконалий остеогенез / А.П. Кризь-Пугач, Ю.М. Гук, О.М. Магомедов та ін. // Проблеми остеології. – 2013. – Т. 16. – №3. – С. 18–21.
6. Недосконалий остеогенез: патогенез, класифікація, клінічна картина, лікування / В.В. Поворознюк, Е.Я. Гречанина, Е.І. Балацкая, В.М. Вайда // Ортопедия, травматология, протезирование. – 2009. – №4. – С. 110–117.
7. Khurana J.S. Osteoporosis and Metabolic Bone Disease / J.S. Khurana, L.A. Fitzpatrick // Bone Pathology / J.S. Khurana (ed.). – Heidelberg : Humana Press, 2009. – P. 217–237.
8. An update on osteogenesis imperfecta / R. Kocijan, Ch. Muschitz, J. Haschka et al. // Проблеми остеології. – 2013. – Т. 16. – №2. – С. 3–16.
9. Effects of Intravenous Pamidronate Treatment in Infants With Osteogenesis Imperfecta: Clinical and Histomorphometric Outcome / C.F.J. Munns, F. Rauch, R. Travers, F.H. Glorieux // J. Bone and Miner. Res. – 2005. – Vol. 20. – №7. – P. 1235–1243.
10. Rauch F. Pamidronate in Children with Osteogenesis Imperfecta: Histomorphometric Effects of Long-Term Therapy / F. Rauch, R. Travers, F.H. Glorieux // J. Clin. Endocrin. and Metab. – 2006. – Vol. 91. – №2. – P. 511–516.

#### References

1. Grigorovskij, V. V., Guk, Yu. M., Magomedov, S., Stel'makh, V. V., & Zyma, A. M. (2010). Kliniko-morfologicheskie osobennosti porazheniya kostej u bol'nykh nesovershennym osteogenezom [Clinical and morphological peculiarities of bone lesions and correlations of some indices in patients with osteogenesis imperfecta]. *Ortopediya, travmatologiya, protezirovaniye*, 1, 46–54. [in Russian].
2. Hryhorovskiyi, V. V., Huk, Yu. M., Kinchaia-Polishchuk, T. A., Zhezhera, V. M., & Savostikova, N. L. (2005). Histologhiia ta histomorfometriia sponhiozy tazovoi kistky ditei ta pidlitkiv u normi, pry neurofibromatozi I typu ta inshykh zakhvoriuvaniakh [Histological properties and histomorphometric parameters of iliac bone spongiosa in children and adolescents in the norm, in patients with neurofibromatosis and other diseases]. *Zhurnal akademii medychnykh nauk Ukrainy*, 11(3), 525–539. [in Ukrainian].
3. Hryhorovskiyi, V. V., & Zyma, A. M. (2013). Patohistologhični vlastyvości ta histomorfometryčni kharakterystyky hubchastoї kistkovoї tkanyny v iliobiotatakh vid khvorykh na nedoskonalyi osteohenez [Pathohistological properties and histomorphometric characteristics of cancellous bone tissue in iliobiopsies of patients with osteogenesis imperfecta]. *Pathologia*, 1, 71–76. [in Ukrainian].
4. Huk, Yu. M., Haiko, O. G., Zyma, A. M., Kinchaia-Polishchuk, T. A., & Zotia, A. V. (2014). Rentshenivska densytometriia v otsintsi strukturno-funktsionalnoho stanu kistkovoї tkanyny v patsiiientiv iz nedoskonalym osteohenezom [X-Ray Densitometry in Assessment of the Structural and Functional State of Bone in the Patients with Osteogenesis Imperfecta]. *Bol' Sustavy. Pozvonochnik*, 1–2, 42–46. [in Ukrainian].

5. Krys-Puhach, A. P., Huk, Yu. M., Mahomedov, O. M., Zyma, A. M., Kinchaia-Polishchuk, T. A., & Zotia, A. V. (2013) Metabolizm kistkovoi tkanyu u khvorykh na nedoskonalyi osteohenez [Bone tissue metabolism in patients with osteogenesis imperfecta]. *Problemy osteologii*, 16(3), 18–21. [in Ukrainian].
6. Povoroznyuk, V. V., Grechanina, Ye. Ya., Balackaya, Ye. I., & Vajda, V. M. (2009) Nesovershennyi osteohenez: patogenez, klassifikatsiya, klinicheskaya kartina, lechenie [Osteogenesis imperfecta: pathogenesis, classification, clinical presentation, treatment]. *Ortopediya, travmatologiya, protezirovanie*, 4, 110–117. [in Russian].
7. Khurana, J. S., & Fitzpatrick, L. A. (2009). Osteoporosis and Metabolic Bone Disease. *JBone Pathology*. S. Khurana (Ed.). Heidelberg: Humana Press, 217–237.
8. Kocijan, R., Muschitz, Ch., Haschka, J., & Resch, H. (2013) An update on osteogenesis imperfecta. *Problemy osteologii*, 16(2), 3–16.
9. Munns, C. F. J., Rauch, F., Travers, R., & Glorieux, F. H. (2005) Effects of Intravenous Pamidronate Treatment in Infants With Osteogenesis Imperfecta: Clinical and Histomorphometric Outcome. *J. Bone and Miner. Res.*, 20(7), 1235–1243.
10. Rauch, F. Travers, R., & Glorieux, F. H. (2006) Pamidronate in Children with Osteogenesis Imperfecta: Histomorphometric Effects of Long-Term Therapy. *J. Clin. Endocrin. and Metab.*, 91(2), 511–516. doi:10.1210/jc.2005-2036.

**Сведения об авторах:**

Григоровский В.В., д. мед. н., профессор, врач-патологоанатом высшей категории, гл. научный сотрудник отдела патоморфологии с экспериментально-биологическим отделением (виварием), ГУ «Институт травматологии и ортопедии НАМН Украины», E-mail: val\_grigorov@bigmir.net.

Зима А.Н., к. мед. н., врач травматолог-ортопед высшей категории, ст. научный сотрудник отдела ортопедии и травматологии детского возраста, ГУ «Институт травматологии и ортопедии НАМН Украины».

Гук Ю.Н., д. мед. н., профессор, врач травматолог-ортопед высшей категории, зав. отделом ортопедии и травматологии детского возраста, ГУ «Институт травматологии и ортопедии НАМН Украины».

Магомедов С., д. биол. н., профессор, зав. лабораторией клинической биохимии, ГУ «Институт травматологии и ортопедии НАМН Украины».

Гайко О.Г., д. мед. н., зав. отделом функциональной диагностики, ГУ «Институт травматологии и ортопедии НАМН Украины».

Кинчая-Полищук Т.А., к. мед. н., врач травматолог-ортопед высшей категории, ведущий научный сотрудник отдела ортопедии и травматологии детского возраста, ГУ «Институт травматологии и ортопедии НАМН Украины».

**Відомості про авторів:**

Григоровський В.В., д. мед. н., професор, лікар-патологоанатом вищої категорії, гол. науковий співробітник відділу патоморфології з експериментально-біологічним відділенням (виварієм), ДЗ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України», E-mail: val\_grigorov@bigmir.net.

Зима А.Н., к. мед. н., лікар травматолог-ортопед вищої категорії, ст. науковий співробітник відділу ортопедії та травматології дитячого віку, ДЗ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України».

Гук Ю.Н., д. мед. н., професор, лікар травматолог-ортопед вищої категорії, зав. відділом ортопедії та травматології дитячого віку, ДЗ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України».

Магомедов С., д. біол. н., професор, зав. лабораторією клінічної біохімії, ДЗ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України».

Гайко О.Г., д. мед. н., зав. відділу функціональної діагностики, ДЗ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України».

Кінча-Поліщук Т.А., к. мед. н., лікар травматолог-ортопед вищої категорії, пров. науковий співробітник відділу ортопедії та травматології дитячого віку, ДЗ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України».

**Information about authors:**

Hryhorovskiy V.V., MD, PhD, DSci, Professor, Doctor-pathologist of Higher Category, Principal Research Associate of the Department of Pathomorphology with Experimental-biological division (vivarium) of SI «Institute of Traumatology and Orthopaedics of National AMS of Ukraine», E-mail: val\_grigorov@bigmir.net

Zyma A.M., MD, PhD, Senior Research Associate, Doctor Traumatologist-Orthopaedist of Higher Category, Senior Research Associate of the Department of Children Orthopaedics and Traumatology of SI «Institute of traumatology and orthopaedics of National AMS of Ukraine».

Guk Yu.M., MD, PhD, DSci, Professor, Doctor Traumatologist-Orthopaedist of Higher Category, Head of the Department of Children Orthopaedics and Traumatology of SI «Institute of Traumatology and Orthopaedics of National AMS of Ukraine».

Mahomedov S., Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Laboratory of Clinical Biochemistry of SI «Institute of Traumatology and Orthopaedics of National AMS of Ukraine».

Gayko O.G., MD, PhD, DSci, Head of the Department of Functional Diagnostics of SI «Institute of Traumatology and Orthopaedics of National AMS of Ukraine».

Kintchaia-Polishchuk T.A., MD, PhD, Doctor Traumatologist-Orthopaedist of Higher Category, Leading Research Associate of the Department of Children Orthopaedics and Traumatology of SI «Institute of Traumatology and Orthopaedics of National AMS of Ukraine».

Надійшла в редакцію 19.03.2015 р.



Д. В. Щукин<sup>1,3</sup>, И. И. Яковцова<sup>2</sup>, В. Н. Лесовой<sup>1,3</sup>, С. В. Данилюк<sup>2</sup>, М. Н. Бабич<sup>3</sup>,  
В. Д. ТОВАЖНЯНСКАЯ<sup>3</sup>, В. Н. ДЕМЧЕНКО<sup>3</sup>

## Иммуногистохимические характеристики почечно-клеточного рака с внутривенным распространением

<sup>1</sup>Харьковский национальный медицинский университет,

<sup>2</sup>Харьковская медицинская академия последипломного образования,

<sup>3</sup>КУОЗ «Областной центр урологии и нефрологии им. В.И. Шاپовала», г. Харьков

**Ключевые слова:** почечно-клеточный рак, иммуногистохимия, тромб, матриксная металлопротеиназа 9.

К настоящему времени фактически не изучены иммуногистохимические характеристики и не выработана общая теория формирования внутривенных неопластических тромбов. С целью уточнения патогенеза макроскопического внутривенного распространения почечно-клеточного рака с внутривенной инвазией и без нее у 94 больных иммуногистохимическим методом исследована экспрессия MMP-9, коллагена IV типа, маркера эндотелиальных клеток (CD 31) и фактора роста эндотелия сосудов (VEGF). Установлено, что экспрессия MMP-9 и VEGF была гораздо выше в группе с макроскопическим внутривенным распространением опухоли и не коррелировала с протяженностью опухолевого тромба или с размерами основной опухоли. Это свидетельствует, что MMP-9 и VEGF играют важную роль в патогенезе внутривенного распространения почечно-клеточного рака.

### Імуногістохімічні характеристики нирково-клітинного раку з внутрішньовенним поширенням

Д. В. Щукін, І. І. Яковцова, В. М. Лісовий, С. В. Данилюк, М. М. Бабич, В. Д. ТОВАЖНЯНЬСКА, В. М. ДЕМЧЕНКО

Дотепер фактично не вивченими є імуногістохімічні характеристики і не сформульована загальна теорія виникнення внутрішньовенних неопластичних тромбів. З метою уточнення патогенезу макроскопічного внутрішньовенного поширення нирково-клітинного раку з внутрішньовенною інвазією і без неї у 94 хворих імуногістохімічним методом дослідили експресію MMP-9, колагену IV типу, маркера ендотеліальних клітин (CD 31) і фактора росту ендотелію судин (VEGF). Встановили, що експресія MMP-9 і VEGF була набагато вищою у групі із макроскопічним внутрішньовенним поширенням пухлини і не корелювала з протяжністю пухлинного тромбу або з розмірами основної пухлини. Це свідчить, що MMP-9 і VEGF відіграють важливу роль у патогенезі внутрішньовенного поширення нирково-клітинного раку.

**Ключові слова:** нирково-клітинний рак, імуногістохімія, тромб, матриксна металопротеїназа 9.

**Патологія.** – 2015. – №1 (33). – С. 65–69

### Immunohistochemical characteristics of renal cell carcinoma with intravenous extension

D. V. Shchukin, I. I. Yakovtsova, V. N. Lesovoy, S. V. Danyluk, M. N. Babich, V. D. Tovazhnyanska, V. N. Demchenko

Up to this day, there is still no sufficient data on immunohistochemical characteristics of intravenous neoplastic thrombi, as well as there is still no general theory about their formation process.

Aim. In order to clarify the pathogenesis of macroscopic intravenous proliferation of renal cell carcinoma, both with and without intravenous invasion, in the group of 94 patients the expression of MMP-9, type IV collagen, a marker of endothelial cells (CD 31) and vascular endothelial growth factor (VEGF) were assessed by immunohistochemical tests.

Methods and results. It was determined, that the expression of MMP-9 and VEGF was significantly higher in the group with macroscopic intravenous tumor proliferation, and it did not correlate either with the extent of thrombus or primary tumor size.

Conclusion. The results are evident of important role of the matrix metalloproteinase-9 and VEGF in the intravenous proliferation of RCC pathogenesis.

**Key words:** Renal Cell Carcinoma, Thrombosis, Matrix Metalloproteinase 9, Immunohistochemistry.

**Pathologia.** 2015; №1 (33): 65–69

Формирование опухолевых тромбов в просвете почечной и нижней полой вены (НПВ) представляет собой одну из особенностей почечно-клеточного рака. Данный феномен обнаруживают у 4–10% пациентов. Он до сих пор является предметом множества дискуссий как в клинической, так и в морфологической среде [1–3]. Фактически не изученными остаются иммуногистохимические характеристики этих опухолей и не сформулирована общая теория формирования внутривенных неопластических тромбов.

Считается, что способность почечно-клеточного рака к инвазии во многом определяется разрушением опухолью

экстрацеллюлярного матрикса путем местной продукции желатиназных энзимов, в частности матриксных металлопротеиназ (MMP) [4,5]. Биологический потенциал этих ферментов – способность разрушать протеины экстрацеллюлярного матрикса, прежде всего коллаген IV типа, что обуславливает повышенную миграцию клеток, принимающих участие в ангиогенезе новообразований. Вместе с тем, усиление миграционной способности клеток связано не только с деструкцией базальных мембран и межклеточного матрикса, но и с изменением состояния гликопротеинов эндотелия, обладающих адгезивными свойствами, такого как маркер эндотелиальных клеток

CD 31 [6]. Во многих экспериментальных исследованиях доказана корреляционная взаимосвязь между повышением экспрессии MMP-9 опухолевыми и/или стромальными клетками с метастазированием и ангиогенезом. При этом ключевым активатором неоангиогенеза считают фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) [7–8].

### Цель работы

Исследование экспрессии различных иммуногистохимических параметров, а именно MMP-9, коллагена IV типа, маркера эндотелиальных клеток (CD 31) и фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) для уточнения патогенеза макроскопического внутривенозного распространения почечно-клеточного рака.

### Материалы и методы исследования

Патоморфологическое исследование опухолей почек проводили в лаборатории кафедры патологической анатомии Харьковской медицинской академии последипломного образования. В работу включены только наблюдения светлоклеточного почечно-клеточного рака.

Для изучения морфологических особенностей ткани опухоли и внутривенных опухолевых тромбов у больных почечно-клеточным раком проведено гистологическое исследование 94 новообразований, удаленных хирургическим путем. Все наблюдения разделены на 3 группы:

- 1 группа – почечно-клеточный рак без признаков макро- или микроскопической инвазии в венозные сосуды (n=21);
- 2 группа – почечно-клеточный рак с микроскопической внутривенной инвазией (n=22);
- 3 группа – почечно-клеточный рак с макроскопической инвазией в венозные сосуды почки и нижнюю полую вену (n=51).

Возраст пациентов варьировал от 24 до 86 лет и составлял в среднем 57,8 лет. Мужчин от общего числа наблюдений было почти в 1,5 раза больше, чем женщин: 56 (59,6%) против 38 (41,4%). Эта тенденция отчетливо прослеживалась и в каждой отдельной выборке.

Операционный материал подлежал макроскопическому и микроскопическому исследованию с учетом размеров и характера роста опухолей, наличия микро- и макроинвазии опухолевых тромбов в венозные сосуды (сегментарные вены, почечная вена, нижняя полая вена), их протяженности и гистологической структуры.

Для гистологического исследования иссекали кусочки из различных зон опухолевых узлов, в наблюдениях с макроинвазией в венозные сосуды – из различных участков опухолевых тромбов (начало, тело и конец тромба, место инвазии в стенку сосуда) (всего 6–8 кусочков). Фрагменты ткани фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, забуференном фосфатным буфером. Затем материал подвергался стандартной проводке по этанолам возрастающей концентрации, хлороформом, заливался парафином. Из приготовленных парафиновых блоков изготавливали серийные срезы толщиной 3–4 мкм. Во всех случаях использовали стандартные методы окраски гематоксилином и эозином, пикрофуксином по ван Гизону.

Во всех наблюдениях выполнили иммуногистохимическое исследование. Иммуногистохимическим методом в эпителиальных опухолевых клетках и в ткани опухолевых тромбов определяли особенности распределения маркера почечно-клеточного рака (Renal Cell Carcinoma Marker – RCC), низкомолекулярных цитокератинов (Cytokeratin PAN AE1/AE3) и содержание металлопротеиназы-9 (MMP-9, 92kDa Collagenase IV); для установления «зрелости» тромбов изучали экспрессию коллагена IV типа (Collagen IV CIV22); для установления особенностей их васкуло- и ангиогенеза – экспрессию фактора роста эндотелия сосудов (VEGF VG1) и маркера эндотелиальных клеток (CD 31 JC 70A). В структурах сосудов определяли количество и особенности распределения гладкомышечного актина (Smooth Muscle Actin 1A4) и коллагена IV типа. Использовали мышинные моноклональные антитела (МКАТ) фирмы DAKO (Дания), Ready-to-Use (Cytokeratin PAN AE1/AE3, Renal Cell Carcinoma Marker, CD 31 JC 70A, Smooth Muscle Actin 1A4), концентрированные МКАТ фирмы DAKO (Collagen IV CIV22, VEGF VG1 в разведении 1:50) и концентрированные кроличьи поликлональные антитела (ПКАТ) к MMP-9, 92kDa Collagenase IV фирмы Thermo scientific (Великобритания) в разведении 1:50. Материал для исследования методами иммуногистохимии фиксировали 10% нейтральным формалином в течение 24 ч, заливали в парафин, готовили срезы толщиной 4 мкм, которые наносили на высокоадгезивные стекла и высушивали при температуре 37°C в течение 18 часов. Демаскирующая термическая обработка выполнена по методу кипячения срезов в цитратном буфере (pH 6,0), для некоторых антител (RCC) использовали протеазную обработку. Для визуализации первичных антител применяли систему детекции UltraVision Quanto Detection Systems HRP Polymer (Thermo scientific). В качестве хромогена использовали DAB (диаминобензидин).

Подсчет результатов осуществляли при помощи окулярной сетки Автандилова [9] в 10 произвольно выбранных полях зрения при увеличении  $\times 400$ . Иммуногистохимическую метку оценивали по двум параметрам: степень распространения и интенсивность окраски. Степень распространения метки учитывали по процентному содержанию окрашенной цитоплазмы клеток от общего числа клеток в поле зрения. Для оценки степени выраженности (интенсивности) окраски использовали полуколичественную шкалу: + – слабая, ++ – умеренная, +++ – выраженная цитоплазматическая (для RCC, Cytokeratin PAN, MMP-9, CD 31, Collagen IV, Smooth Muscle Actin, VEGF) или мембранная (для Cytokeratin PAN, RCC, CD 31) реакция.

Комплекс морфологических и морфометрических исследований проведен на микроскопе Primo Star (Carl Zeiss) с использованием программ AxioCam (ERc 5s) и Microsoft Excel.

### Результаты и их обсуждение

Основные характеристики исследованных опухолей представлены в *таблице 1*.

Основные характеристики исследованных опухолей

Исследованные параметры	Группа 1	Группа 2	Группа 3
Сторона поражения: - Правая - Левая	11 (47,6%) 10 (52,4%)	9 (40,9%) 13 (59,1%)	29 (56,9%) 22 (43,1%)
Размеры опухолей	5,5 см (от 2,5 см до 7,1 см)	6,8 см (от 3,2 см до 9,6 см)	7,4 см (от 3,8 см до 12,3 см)
Уровень распространения тромба: - Почечная вена - Каворенальный сегмент НПВ - Подпеченочный сегмент НПВ - Ретропеченочный сегмент НПВ - Супрадиафрагмальная НПВ			18 (35,3%) 8 (15,7%) 12 (23,5%) 11 (21,6%) 2 (3,9%)
Тромб с признаками ретроградного распространения			4 (7,8%)
Градации по Fuhrman: 1 2 3	11 (52,4%) 8 (38,1%) 2 (9,5%)	2 (9,1%) 12 (54,5%) 8 (36,4%)	5 (9,8%) 28 (54,9%) 18 (35,3%)
Инвазия в жир	0	3 (13,6%)	21 (41,2%)
Отдаленные метастазы	0	2 (9,1%)	8 (15,7%)
Лимфатические метастазы	0	1 (4,5%)	3 (5,9%)

Диаметр опухолей варьировал от 2,5 до 12,3 см (в среднем 6,9 см). В отличие от опухолей без интралюминальной инвазии или с микроскопической инвазией, группа макроскопического внутривенного распространения представлена преимущественно крупными новообразованиями размерами более 7,0 см (14,3% по сравнению с 54,9%). Хорошо отграничена от почечной паренхимы и жировой клетчатки плотной соединительнотканной капсулой была 71 (75,5%) опухоль. В остальных случаях (24,5%) имело место частичное разрушение капсулы в виде разволокнения, истончения или отека.

Гистологическое строение внутривенных опухолевых тромбов в большинстве случаев имело черты основной опухоли. Основная часть клеточных элементов тромба представлена раковыми клетками, кроме того, в его состав входили сосуды, фибрин и соединительная ткань в различных соотношениях. Грубые фиброзные перегородки отмечены в 82,4% наблюдений.

#### Опухоли без внутривенной инвазии (1 группа)

При изучении особенностей распределения и экспрессии MMP-9 в опухолях первой группы отмечено, что в 17 из 21 наблюдений (80,9%) экспрессия MMP-9 была слабой, равномерной, преимущественно цитоплазматической почти в 60% эпителиоцитов. В 4 (19%) случаях в цитоплазме, кое-где в клеточных мембранах и эндотелиоцитах реакцию можно было расценить как очаговую умеренную. Однако усиление окраски (++) зафиксировано лишь в 12% клеточных элементов.

Эндотелиальные клетки капилляров паренхимы карцином визуализировались с помощью МКАТ CD 31 в виде нежной петливой сети. Диаметр их не превышал 6–8 мкм, а количество на единицу площади было неодинаковым – от 5–10 до 15–20 в поле зрения на увеличении 400. Однако распределение хромогена в клетках эндотелия было равномерным, тонкодисперсным, показало непрерывность эндотелиального слоя, что характеризовало его целостность.

Коллаген базальных мембран капилляров почечно-клеточных карцином без инвазии в венозные сосуды давал выраженную позитивную реакцию в 76,2% наблюдений (16 опухолей из 21). Его можно было обнаружить как диффузное почти непрерывное окрашивание

перикапиллярных зон и местами в единичных соединительнотканых волокнах стромы опухоли.

Иная картина обнаружена при исследовании фактора роста эндотелия сосудов в 1 группе наблюдения. Лишь в 2 случаях отмечено слабое неравномерное, а чаще точечное, пылевидное окрашивание волокон стромы новообразований и единичных эпителиальных клеток. В подавляющем большинстве карцином данной группы реакция с МКАТ к VEGF была негативной – 90,5% случаев. Таким образом, для светлоклеточных почечно-клеточных карцином без инвазии в просвет венозных сосудов можно определить такой иммунопрофиль: MMP-9 +, CD 31 +, Collagen IV +++, VEGF -.

#### Опухоли с микроскопической внутривенной инвазией (2 группа)

Во 2 группе реакция с металлопротеиназой большей частью демонстрировала умеренную экспрессию как в паренхиме опухолевого узла, так и в ткани опухолевого тромба. Таких случаев было 16 (72,7%). Число позитивно окрашенных клеток приближалось к 78%.

Маркер клеток эндотелия CD 31 демонстрировал сеть капилляров карцином и достаточную сохранность эндотелиальной выстилки вен. Кроме того, позитивная экспрессия данного антитела в клетках, располагающихся в наружных структурах тромбов, подтверждала эндотелизацию их интралюминальной неопластической поверхности.

Стоит подчеркнуть: если в 1 группе исследования, как и в ткани узлов 2 группы, хорошо развитая сеть капилляров представляла собой ритмичную картину с четкими линиями эндотелиальных клеток, то выстилка сосудов опухолевых тромбов с микроваскулярной инвазией не отличалась четкостью, была прерывистой, неравномерной, что подтверждалось очаговостью реакции к CD 31.

Характер иммуногистохимической реакции с коллагеном и фактором роста эндотелия был однонаправленным. Более половины опухолей этой группы, как и опухолевые тромбы, демонстрировали умеренную позитивную реакцию структур (++) для коллагена количество опухолей, чувствительных к МКАТ, составило 59,1% (13 из 22), для VEGF – 63,6% (14 из 22).

Таблица 2

**Иммунореактивность почечно-клеточного рака в зависимости от наличия или отсутствия внутривенного распространения**

Группа наблюдения	МКАТ ПКАТ	MMP-9	Collagen IV	VEGF
1 группа		+ (80,9%)	+++ (76,2%)	- (90,5%)
2 группа		++ (72,7%)	++ (59,1%)	++ (63,6%)
3 группа		+++ (100%)	+ (96,1%)	+++ (92,2%)

Суммируя совокупность реакций в группе опухолей с микроваскулярной инвазией, их иммунофенотип можно представить в таких соотношениях: MMP-9 ++, CD 31 +/-, Collagen IV ++, VEGF ++.

*Опухоли с макроскопической внутривенной инвазией (3 группа)*

В 3 группе наблюдения 100% опухолей отличались высоким содержанием матриксной металлопротеиназы, что подтверждалось диффузной выраженной позитивной реакцией клеток светлоклеточного рака с MMP-9.

Если в первых двух группах исследования окрашенные гранулы располагались преимущественно в цитоплазме и цитоплазматической мембране клеток эпителия, то в данной выборке металлопротеиназу обнаруживали в эндотелиоцитах опухолевого тромба, очагово – в эндотелии вен почек, а также в лимфоцитах, макрофагах, гистиоцитах инфильтрата зоны инвазии стенки вены. В единичных случаях можно говорить и о сверхэкспрессии матриксной металлопротеиназы-9 в опухолевых узлах, когда окраску воспринимали 100% клеток как эпителиального, так и лимфогистиоцитарного ряда. Такие наблюдения (2 из 51 – 3,9% новообразований) отличались также практически полным отсутствием коллагена IV типа как в основном узле, так и в опухолевом тромбе.

В основной массе опухолей с макроваскулярной инвазией коллаген отмечали в толще ткани, в зоне базальных мембран капилляров и вновь образованных сосудов опухолевых тромбов. Однако если в 1 группе он четко визуализировался в виде выраженного диффузного окрашивания этих участков, то здесь обнаруживали либо прерывистые, плохо очерченные контуры капилляров, либо только единичные сетчатые структуры без привязки к просвету сосуда. Содержание CD 31 в эндотелии сосудов опухоли в 3 группе наблюдения было значительно ниже, чем в предыдущих группах.

Экспрессия эндотелиального фактора роста показывала противоположные результаты: 92,2% узлов карцином и тромбов новообразований относились к структурам с VEGF+ статусом.

Экспрессия MMP-9 и VEGF не коррелировала с протяженностью ( $p=0,68$  и  $p=0,96$ ) опухолевого тромба или с размерами основной опухоли ( $p>0,05$ ). Не обнаружили значимых различий при анализе препаратов из различных частей опухолевого тромба. Наличие отдаленных и лимфогенных метастазов, а также низкая степень дифференцировки опухолевых клеток были позитивными прогностическими параметрами в плане обнаружения гиперэкспрессии MMP-9 и VEGF ( $p<0,01$ ).

Таким образом, опухоли и ткань опухолевых тромбов почечно-клеточных карцином с макроваскулярной инвазией характеризуются MMP-9 +++, CD 31 +/-, Collagen IV +, VEGF +++ статусом. Сводные данные по иммунореактивности опухолей приведены в *таблице 2*.

Главными свойствами злокачественного неопластического образования являются прорастание в окружающие ткани и метастатическое распространение по лимфатическим или кровеносным сосудам. Опухолевый тромб при этом можно рассматривать как уникальную морфологическую единицу, так как для него характерны признаки локального распространения и нахождение опухолевых клеток в просвете сосуда.

Результаты нашего исследования продемонстрировали очевидную роль MMP-9 и VEGF в патогенезе внутривенного распространения почечно-клеточного рака. В опухолях без признаков внутривенной инвазии уровень ее экспрессии MMP-9 был низким. Окрашивание фиксировалось преимущественно в цитоплазме и ни в одном из наблюдений не охватывало все опухолевые клетки. Умеренная экспрессия обнаружена лишь у 12% новообразований данной группы. Микроскопическая внутривенная инвазия сопровождалась умеренной экспрессией MMP-9 в более 70% наблюдений. Для макроскопических опухолевых тромбов в почечной или в нижней полой вене была характерна картина «металлопротеиназного взрыва». Все опухоли с этой формой инвазии демонстрировали высокие уровни экспрессии MMP-9. При этом металлопротеиназа отмечена не только в опухолевых клетках, но и в эндотелиоцитах опухолевого тромба и почечных вен, а также в лимфоцитах, макрофагах, гистиоцитах инфильтрата зоны инвазии стенки вены. В отдельных случаях установлена сверхэкспрессия матриксной металлопротеиназы-9, когда окраска фиксировалась в 100% клеток как эпителиального, так и лимфогистиоцитарного ряда. Сверхэкспрессия отмечена у 2 пациентов с тромбами ретропеченочного отдела НПВ и отдаленными метастазами.

Сходная тенденция установлена при исследовании VEGF. Если в 1 группе реакция с МКАТ к VEGF была негативной в 90,5% случаев, то при микроскопической внутривенной инвазии умеренную позитивную реакцию (++) демонстрировали 63,6% опухолей. В группе макроскопических опухолевых тромбов 92,2% новообразований и неопластических тромбов относились к структурам с VEGF+ статусом. Не обнаружили различий в экспрессии MMP-9 и VEGF в основной опухоли и в ткани тромба, также как и в разных участках тромба. Интересно, что уровни матриксной металлопротеиназы-9 и VEGF не зависели от протяженности опухолевого тромба.

При изучении коллагена IV типа отмечена инверсная зависимость по отношению к характеристикам MMP-9 и VEGF. Данный маркер обнаруживали во всех группах новообразований, однако степень интенсивности окраски была гораздо выше в опухолях без признаков микро- или макроскопической внутривенной инвазии.

**Выводы**

MMP-9 и VEGF относятся к одним из наиболее значимых показателей инвазивного потенциала эпителиальных светлоклеточных опухолей почек. Более агрес-

сивный фенотип светлоклеточного почечно-клеточного рака ассоциируется со сверхэкспрессией MMP-9. Матриксная металлопротеиназа-9 и VEGF играют важную роль в патогенезе внутривенного распространения анализируемой патологии. Однако их экспрессия не коррелирует с протяженностью и объемом опухолевого тромба или с размерами основной опухоли.

**Перспективы дальнейших исследований.** Изуче-

ние активности MMP-9 и VEGF в почечно-клеточных опухолях может иметь значительные перспективы в определении метастатического потенциала у пациентов с внутривенным распространением данных новообразований. Для подтверждения этой гипотезы необходимо дальнейшее клинико-морфологическое исследование с изучением корреляций между экспрессией MMP-9, уровнем метастазирования опухолей и выживаемостью пациентов.

### Список литературы

1. Hoehn W. Invasion of veins in renal cell carcinoma – frequency, correlation and prognosis / W. Hoehn, P. Hermanek // *Eur.Urol.* – 1983. – Vol. 9. – P. 24–29.
2. Vein invasion in renal cell carcinoma: impact on metastatic behavior and survival / B. Ljungberg, R. Stenling, B. Osterdahl et al. // *J.Urol.* – 1995. – Vol. 154. – №5. – P. 1681–1684.
3. Переверзев А.С. Хирургия опухолей почки и верхних мочевых путей / А.С. Переверзев. – Харьков: Lora Medpharm, 1997.
4. Bourboulia D. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion / D. Bourboulia, W.G. Stetler-Stevenson // *Seminars in Cancer Biology.* – 2010. – Vol. 20. – P. 161–168.
5. Expression of metalloproteinase 2 and 9 and their inhibitors in renal cell carcinoma / A. Kugler, B. Hemmerlein, P. Thelen et al. // *J.Urol.* – 1998. – Vol. 160. – P. 1914–1918.
6. Аничков Н.М. Биология опухолевого роста (молекулярно-медицинские аспекты) / Н.М. Аничков, И.М. Кветной, С.С. Коновалов. – СПб.: Прайм ЕВРОЗНАК, 2004. – С. 85.
7. Барышников А.Ю. Оценка ангиогенеза опухолей / А.Ю. Барышников, Е.В. Степанова, М.Р. Личиницер // *Успехи современной биологии.* – 2000. – Т. 120. – №6. – С. 599–604.
8. Молекулярные механизмы ангиогенеза в физиологических и патологических процессах / С.В. Луденко, С.М. Киселев, Н.Б. Фельдман, С.Е. Северин // *Введение в молекулярную медицину / под ред. М.А. Пальцева.* – М.: Медицина, 2004. – С. 446–495.
9. Автандилов Г.Г. Основы количественной патологической анатомии: [монография] / Г.Г. Автандилов. – М.: Медицина, 2002. – 240 с.
10. Ljungberg, B., Stenling, R., Osterdahl, B. Farrelly, E., Aberg, T., & Roos, G. (1995) Vein invasion in renal cell carcinoma: impact on metastatic behavior and survival. *J. Urol.*, 154(5), 1681–1684. doi: 10.1016/S0022-5347(01)66749-1.
11. Pereverzev, A. S. (1997) *Khirurgiya opukholej pochki i verkhnikh mochevykh putej [Surgery kidney and upper urinary tract]* / Kharkov: Lora Medpharm [in Ukrainian].
12. Bourboulia, D. & Stetler-Stevenson, W. G. (2010) Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Seminars in Cancer Biology*, 20, 161–168. doi: 10.1016/j.semcancer.2010.05.002.
13. Kugler, A., Hemmerlein, B., Thelen, P. Kallerhoff, M., Radzun, H. J., & Ringert, R. H. (1998) Expression of metalloproteinase 2 and 9 and their inhibitors in renal cell carcinoma. *J. Urol.*, 160, 1914–1918.
14. Anichkov, N. M., Kvetnoj, I. M. & Konovalov, S. S. (2004) *Biologiya opukholevogo rosta [Biology of tumor growth]*. Saint Petersburg: Praim Yevroznak. [in Russian].
15. Baryshnikov, A. Yu., Stepanova, E. V. & Lichincer, M. R. (2000) Ocenka angiogeneza opukholej [Assessment of tumor angiogenesis]. *Uspekhi sovremennoj biologii*, 6, 599–604. [in Russian].
16. Lucenko, C. V., Kiselev, C. M., Fel'dman, N. B. & Severin, C. E. (2004) Molekulyarnye mekhanizmy angiogeneza v fiziologicheskikh i patologicheskikh processakh [Molecular mechanisms of angiogenesis in physiological and pathological processes]. *Vvedenie v molekulyarnuyu medicinu.* V.A. Pal'cev (Ed.). Moscow: Medicina [in Russian].
17. Avtandilov, G. G. (2002) *Osnoyi kolichestvennoj patologicheskoy anatomii [Fundamentals of quantitative pathological anatomy]* / Moskva: Medicina [in Russian].

### Reference

1. Hoehn, W. & Hermanek, P. (1983) Invasion of veins in renal cell carcinoma – frequency, correlation and prognosis. *Eur.Urol*, 9, 24–29.

### Сведения об авторах:

Шукин Д.В., к. мед. н., доцент каф. урологии, нефрологии и андрологии, Харьковский национальный медицинский университет, зав. общепатологическим отделением №1, КУОЗ «Областной центр урологии и нефрологии им. В.И. Шаповала», E-mail: shukindv@gmail.com.  
 Яковцова И.И., д. мед. н., профессор, зав. каф. патологической анатомии, Харьковская медицинская академия последипломного образования.  
 Лесовой В.Н., д. мед. н., профессор, ректор, Харьковский национальный медицинский университет, директор КУОЗ «Областной центр урологии и нефрологии им. В.И. Шаповала», член-корр. НАМН Украины.  
 Данилюк С.В., к. мед. н., доцент каф. патологической анатомии, Харьковская медицинская академия последипломного образования.  
 Бабич М.Н., зав. патологоанатомическим отделением, КУОЗ «Областной центр урологии и нефрологии им. В.И. Шаповала».  
 Товажнянская В.Д., врач-патологоанатом патологоанатомического отделения, КУОЗ «Областной центр урологии и нефрологии им. В.И. Шаповала».  
 Демченко В.Н., к. мед. н., зам. директора по лечебной работе, КУОЗ «Областной центр урологии и нефрологии им. В.И. Шаповала».

### Відомості про авторів:

Шукин Д.В., к. мед. н., доцент каф. урології, нефрології та андрології, Харківський національний медичний університет, зав. загальнопатологічного відділення №1, КЗОЗ «Обласний центр урології та нефрології ім. В.І. Шаповала», E-mail: shukindv@gmail.com.  
 Яковцова І.І., д. мед. н., професор, зав. каф. патологічної анатомії, Харківська медична академія післядипломної освіти.  
 Лісовий В.М., д. мед. н., професор, ректор, Харківський національний медичний університет, директор КЗОЗ «Обласний центр урології та нефрології ім. В.І. Шаповала», чл.-кор. НАМН України.  
 Данилюк С.В., к. мед. н., доцент каф. патологічної анатомії, Харківська медична академія післядипломної освіти.  
 Бабич М.М., зав. патологоанатомічного відділення, КЗОЗ «Обласний центр урології та нефрології ім. В.І. Шаповала».  
 Товажнянська В.Д., лікар-патологоанатом патологоанатомічного відділення, КЗОЗ «Обласний центр урології та нефрології ім. В.І. Шаповала».  
 Демченко В.М., к. мед. н., заст. директора з лікувальної роботи, КЗОЗ «Обласний центр урології та нефрології ім. В.І. Шаповала».

### Information about author:

Shchukin D.V., Candidate of Medical Science, Assistant Professor of Chair of Urology, Nephrology and Andrology of Kharkiv National Medical University, Head of Department of General Urology No1, MIH «Regional Clinical Center of Urology and Nephrology n.a. V.I. Shapoval», Kharkiv, E-mail: shukindv@gmail.com.  
 Lesovoy V.N., a corresponding member of NAMS of Ukraine, Rector of Kharkiv National Medical University, Doctor of Medical Science, Professor, Director of MIH «Regional Clinical Center of Urology and Nephrology n.a. V.I. Shapoval», Kharkiv.  
 Yakovtsova I.I., Doctor of Medical Science, Professor, Head of Chair of Pathological Anatomy of Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education.  
 Danyluk S.V., Candidate of Medical Science, Assistant Professor of Chair of Pathological Anatomy of Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education.  
 Babich M.N., Head of Pathology Department of MIH «Regional Clinical Center of Urology and Nephrology n.a. V.I. Shapoval», Kharkiv.  
 Tovazhnyanska V.D., Staff Pathologist of Pathology Department of MIH «Regional Clinical Center of Urology and Nephrology n.a. V.I. Shapoval», Kharkiv.  
 Demchenko B.N., Candidate of Medical Science, Assistant Director of Clinical Care of MIH «Regional Clinical Center of Urology and Nephrology n.a. V.I. Shapoval», Kharkiv.

Надійшла в редакцію 26.03.2015 р.

И. В. Ивахно

## Диагностическое и прогностическое значение васкуляризации папиллярных микрокарцином щитовидной железы

Харьковская медицинская академия последипломного образования

**Ключевые слова:** папиллярная карцинома, щитовидной железы новообразования, иммуногистохимия.

Неоднородность клинического поведения папиллярных микрокарцином щитовидной железы обуславливает поиск морфологических признаков агрессивного течения заболевания. С целью изучения диагностического значения васкуляризации папиллярных микрокарцином щитовидной железы проведено иммуногистохимическое исследование экспрессии CD34 и VEGF 22 гистологических препаратов. Установлено, что повышение уровня васкуляризации и экспрессии VEGF ассоциируется с опухолевой инвазией, десмоплазией, нарушением созревания соединительной ткани. Не обнаружена зависимость между высоким уровнем васкуляризации и такими прогностическими признаками, как стадия заболевания по классификации TNM, метастазирование, экстраорганный инвазия. Результаты указывают, что васкуляризация служит показателем роста и прогрессии микрокарцином и не является значимым прогностическим фактором заболевания.

### Діагностичне та прогностичне значення васкуляризації папілярних мікрокарцином щитовидної залози

I. V. Ivakhno

Неоднорідність клінічної поведінки папілярних мікрокарцином щитовидної залози зумовлює пошук морфологічних ознак агресивного перебігу захворювання. З метою вивчення діагностичного значення васкуляризації папілярних мікрокарцином щитовидної залози здійснили імуногістохімічне дослідження експресії CD34 і VEGF 22 гістологічних препаратів. Виявили, що підвищення рівня васкуляризації та експресії VEGF асоціюється з пухлинною інвазією, десмоплазією, порушенням дозрівання сполучної тканини. Не визначили залежність між високим рівнем васкуляризації й такими прогностичними ознаками, як стадія захворювання за класифікацією TNM, метастазування, екстраорганна інвазія. Результати свідчать, що васкуляризація є показником росту та прогресії мікрокарцином і не є значущим прогностичним чинником захворювання.

**Ключові слова:** папілярна карцинома, щитовидної залози новоутворення, імуногістохімія.**Патологія.** – 2015. – №1 (33). – С. 70–72

### The diagnostic and prognostic value of vascularization in papillary thyroid microcarcinomas

I. V. Ivakhno

Aim. Variety of clinical behavior of the thyroid microcarcinomas (PTM) is the reason for searching for the morphologic features of aggressive disease course.

Methods and results. In 22 cases of PTM immunohistochemical examination of CD34 and VEGF expression was performed to investigate the diagnostic and prognostic value of vascularization. The association between high level expression of VEGF, microvessels density and morphological features such as tumor invasion, desmoplastic stromal reaction, disorder of connective tissue maturation was revealed. The relationship between high levels of vascularization and TNM stage of disease, lymph node metastasis, extrathyroid invasion was not found.

Conclusion. Results indicate that the vascularization is a sign of growth and progression of microcarcinomas and it is not a significant predictor of the disease.

**Key words:** Papillary, Carcinoma, Thyroid Neoplasms, Immunohistochemistry.**Pathologia.** 2015; №1 (33): 70–72

Папиллярные микрокарциномы щитовидной железы (ПМЦЖ) определяются, согласно классификации ВОЗ, как папиллярные раки щитовидной железы (ЩЖ) до 1 см в наибольшем размере [9]. Выбор лечебной тактики больных ПМЦЖ обусловлен наличием прогностических факторов течения заболевания [5]. Неблагоприятные факторы: метастазирование, рецидивирование, экстраорганный инвазия, BRAF-мутации [7,12]. Ряд авторов факторами плохого прогноза ПМЦЖ считают также мужской пол, возраст старше 45 лет, размер опухоли более 5 мм, мультифокальный рост, десмоплазию стромы [3,7]. Неоангиогенез сопровождает прогрессию и метастазирование опухолей различной локализации [6]. В научной литературе есть немногочисленные противоречивые сведения о прогностическом значении ангиогенеза для ПМЦЖ [4].

### Цель работы

Изучение ангиогенеза в папиллярных микрокарцином щитовидной железы для прогноза течения заболевания.

### Материалы и методы исследования

Материал исследования – гистологические препараты ПМЦЖ с удаленными регионарными лимфатическими узлами 22 больных (4 мужчин и 18 женщин в возрасте от 22 до 68 лет), оперированных в клиниках Харькова.

Морфологически материал изучали с применением гистологических методов окраски (гематоксилин + эозин) и иммуногистохимических методов с использованием мышиных моноклональных антител (фирмы DAKO) к CD34 и VEGF. Плотность микрососудов подсчитывали в участках опухоли с наибольшей их концентрацией (по методу vascular hot spot) на  $\times 400$  увеличении микроскопа. Слабым уровнем окраски VEGF считали при его экспрессии менее чем в 5% опухолевых клеток, умеренным – в 5–10%, выраженным – в более 50% клеток.

**Плотность микрососудов и уровень экспрессии VEGF в ПМЦЖ с различными морфологическими и прогностическими признаками**

Признак	Плотность микрососудов	VEGF		
		+	++	+++
Метастазирующие	126,1±35,3	6 (46,1)	5 (38,4)	2 (15,3)
Неметастазирующие	107,8±25,9	6 (66,6)	2 (22,2)	1 (1,11)
Экстраорганный инвазия	131,0±26,5	5 (50,0)	3 (30,0)	2 (20,0)
Без экстраорганный инвазии	112,5±43,2	7 (58,3)	4 (33,3)	1 (8,3)
I стадия	119,4±33,6	8 (80,0)	2 (20,0)	0
II стадия	-	-	-	-
III стадия	138,2±27,3	4 (44,4)	3 (33,3)	2 (22,2)
IV стадия	127,9±24,5	0	2 (66,6)	1 (33,4)
Центральная зона	103±26,2	17 (77,2)	5 (22,7)	0
Зона инвазии	146,3±27,5*	10 (45,5)	7 (31,8)	5 (23,7)*
<b>Десмоплазия</b>				
- без десмоплазии	91,0±17,6*	2 (100)	0	0*
- слабая	117,0±26,2	1 (50,0)	1 (50,0)	0
- умеренная	128,0±34,9	4 (50,0)	2 (25,0)	2 (25,0)
- выраженная	120,0±36,4	5 (50,0)	4 (40,0)	1 (10,0)
<b>Зрелость стромы</b>				
- молодая	141,0±42,2	0	0	2 (100)
- смешанная	138,0±34,4	5 (45,4)	5 (45,4)	1 (9,1)
- зрелая	86,0±22,1*	5 (71,4)	2 (28,5)	0*

*Примечания:* степень выраженности экспрессии VEGF: (+) – слабая, (++) – умеренная, (+++) – выраженная; числовое значение в процентах (%); \* – достоверно значимое различие (p<0,05).

Для статистической оценки различия между группами исследования использовали непараметрический метод Манна – Уитни.

**Результаты и их обсуждение**

Средняя плотность микрососудов в ПМЦЖ составила 120,0±33,6, наименьшее число – 35,5, наибольшее – 210,0. В перитуморальной неизмененной ткани ЦЖ средняя плотность микрососудов составила 42,06±13,30 (от 20 до 55).

В зонах инвазии отмечено повышение уровня васкуляризации (p<0,001) и экспрессии VEGF (p<0,05). Не установлена корреляция повышения средней плотности микрососудов в метастазирующих ПМЦЖ у пациентов с III или IV стадиями заболевания в микрокарциномах с экстраорганный инвазией.

При сравнении ПМЦЖ без десмоплазии с микрокарциномами, имеющими десмоплазию, а также между группой ПМЦЖ с исключительно зрелой стромой и микрокарциномами, имеющими смешанную и молодую строму, отмечены достоверно значимые различия по показателю средней плотности микрососудов и выраженности экспрессии VEGF (p<0,05 и p<0,05 соответственно). Высокий уровень васкуляризации и экспрессии VEGF ассоциируется с десмоплазией (фиброзированием) и молодой или смешанной стромой (т.е. нарушением качества дозревания стромы с беспорядочным расположением коллагеновых волокон, базофилией, отеком, наличием активных фибробластов).

По данным некоторых авторов, плотность микрососудов в папиллярных раках ЦЖ ассоциируется с более агрессивным инвазивным ростом [8], более частым метастазированием в лимфатические узлы шеи, повы-

шенным риском рецидивирования и меньшим сроком выживания пациентов [4,8]. В результате нашего исследования не обнаружена корреляция между высоким уровнем васкуляризации ПМЦЖ и такими неблагоприятными факторами, как поздняя стадия заболевания, метастазирование и экстраорганный инвазия.

Некоторые исследователи приходят к выводу, что ангиогенез играет важную роль лишь в развитии рака ЦЖ, не являясь при этом значимым прогностическим фактором [2,10]. Так, выраженность соединительнотканного каркаса опухоли в значительной степени связана с уровнем кровоснабжения и характером сосудов микроциркуляторного русла. Плотность микрососудов положительно коррелирует с объемом опухолевой стромы [11]. Наше исследование показало, что высокий уровень васкуляризации ассоциируется с фиброзированием и десмопластической реакцией стромы, которые сопровождают инвазию и малигнизацию опухолей ЦЖ [1]. Отмечено также повышение васкуляризации в зонах инвазии, что подтверждает факт участия ангиогенеза в росте и развитии ПМЦЖ.

**Выводы**

1. Высокая плотность микрососудов и повышение экспрессии VEGF не относится к значимым прогностическим факторам заболевания (метастазирование, экстраорганный инвазия, поздняя стадия по классификации TNM).

2. Повышение уровня васкуляризации и экспрессии VEGF ассоциируется с инвазией ПМЦЖ (p<0,001 и p<0,05 соответственно), десмоплазией (p<0,05 и p<0,05 соответственно), со смешанной либо незрелой стромой (p<0,05 и p<0,05 соответственно), тем самым служит показателем роста и прогрессии микрокарцином.

**Список литературы**

1. Хазієв В.В. Особливості експресії колагенів у вузлових новоутвореннях щитоподібної залози / В.В. Хазієв // Проблеми ендокринної патології. – 2013. – №2. – С. 39–45.
2. Akslen L.A. Increased angiogenesis in papillary thyroid carcinoma but lack of prognostic importance / L.A. Akslen, V.A. Livolsi // *Hum. Pathol.* – 2000. – Vol. 31. – P. 439–42.
3. Cappelli C. Aggressiveness and outcome of papillary thyroid carcinoma (PTC) versus microcarcinoma (PMC): a mono-institutional experience / C. Cappelli, M. Castellano, M. Braga // *J. Surg. Oncol.* – 2007. – №95. – P. 555–60.
4. Cheong H. Microvessel and Lymphatic Vessel Density and VEGFR-3 Expression of Papillary Thyroid Carcinoma with Comparative Analysis of Clinicopathological Characteristics / H. Cheong, H. Kang, H.K. Kyung et al. // *The Korean Journal of Pathology*. – 2010. – Vol. 44. – P. 243–51.
5. Cho J. Clinical features and prognostic factors in papillary thyroid microcarcinoma depends on age / J. Cho, J. Kim, C. Jeong // *J. Korean Surg. Soc.* – 2012. – Vol. 82(5). – P. 281–287.
6. He Y. Role of lymphangiogenic factors in tumor metastasis / Y. He, K. Karpanen, T. Alitalo // *Biochim Biophys Acta.* – 2004. – Vol. 1654(1). – P. 3–12.
7. Desmoplastic stromal reaction in papillary thyroid microcarcinoma / O. Koperek, R. Asari, B. Niederle, K. Kaserer // *Histopathology*. – 2011. – Vol. 58(6). – P. 919–924.
8. Liang Q.C. Expression of VEGF-C and angiogenesis, and lymphangiogenesis in papillary thyroid carcinoma / Q.C. Liang, Q.Y. Wei, S.Q. Fan // *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* – 2006. – Vol. 31. – P. 414–416.
9. World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Endocrine Organs / R. Lloyd, R. De Lellis, P. Heitz, C. Eng. – Lyon : IARC Press International Agency for Research on Cancer, 2004. – 320 p.
10. Angiogenesis and lymphangiogenesis in thyroid proliferative lesions: relationship to type and tumour behaviour / N.G. Torre, I. Buley, J.A. Wass, H.E. Turner // *Endocr. Relat. Cancer.* – 2006. – Vol. 13(3). – P. 931–944.
11. Vong S. The Role of Stromal Myofibroblast and Extracellular Matrix in Tumor Angiogenesis / S. Vong, R. Kalluri // *Genes Cancer.* – 2011. – Vol. 2(12). – P. 1138–1145.
12. Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid microcarcinoma: the promise of better risk management / M. Xing // *Ann. Surg. Oncol.* – 2009. – Vol. 16. – P. 801–803.
1. Khaziev, V. V. (2013). Osoblyvosti ekspresii kolaheniv u vuzlovykh novoutvorenniakh shchytobodibnoi zalozy [Feathers of the collagen expression in nodal neoplasm of the thyroid gland]. *Problemy endokrynnoi patolohii*, 2, 39–45. [in Ukrainian].
2. Akslen, L. A. & Livolsi, V. A. (2000). Increased angiogenesis in papillary thyroid carcinoma but lack of prognostic importance. *Hum. Pathol.*, 31, 439–42. doi:10.1053/1-ip.2000.6548.
3. Cappelli, C., Castellano, M., & Braga M. (2007). Aggressiveness and outcome of papillary thyroid carcinoma (PTC) versus microcarcinoma (PMC): a mono-institutional experience. *J. Surg. Oncol.*, 95, 555–60. doi: 10.1002/jso.20746.
4. Cheong, H. (2010). Microvessel and Lymphatic Vessel Density and VEGFR-3 Expression of Papillary Thyroid Carcinoma with Comparative Analysis of Clinicopathological Characteristics. *The Korean Journal of Pathology*, 44, 243–51. doi: 10.4132/KoreanJPathol.2010.44.3.243.
5. Cho, J., Kim, J., & Jeong, C. (2012). Clinical features and prognostic factors in papillary thyroid microcarcinoma depends on age. *J Korean Surg Soc.*, 82(5), 281–287. doi: 10.4174/jkss.2012.82.5.281.
6. He, Y. (2004). Role of lymphangiogenic factors in tumor metastasis. *Biochim Biophys Acta*, 1654(1), 3–12. doi: 10.1016/j.bbcan.2003.07.003.
7. Koperek, O., Asari, R., Niederle, B., & Kaserer, K. (2011). Desmoplastic stromal reaction in papillary thyroid microcarcinoma. *Histopathology*, 58(6), 919–24. doi: 10.1111/j.1365-2559.2011.03791.x.
8. Liang, Q. C., Wei, Q. Y., & Fan, S. Q. (2006). Expression of VEGF-C and angiogenesis, and lymphangiogenesis in papillary thyroid carcinoma. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.*, 31, 414–416.
9. Lloyd, R., De Lellis, R., Heitz, P., & Eng, C. (2004). World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Endocrine Organs. Lyon: IARC Press International Agency for Research on Cancer.
10. Torre, N. G., Buley, I., Wass, J. A. & Turner, H. E. (2006). Angiogenesis and lymphangiogenesis in thyroid proliferative lesions: relationship to type and tumour behaviour. *Endocr. Relat. Cancer*, 13(3), 931–944. doi: 10.1677/erc.1.01210
11. Vong, S. & Kalluri, R. (2011). The Role of Stromal Myofibroblast and Extracellular Matrix in Tumor Angiogenesis. *Genes Cancer*, 2(12), 1138–1145. doi: 10.1177/1947601911423940.
12. Xing, M. (2007). BRAF mutation in papillary thyroid microcarcinoma: the promise of better risk management. *Ann. Surg. Oncol*, 28(7), 742–62. doi: 10.1245/s10434-008-0298-z.

**References**

**Сведения об авторе:**

Ивахно И.В., аспирант каф. патологической анатомии, Харьковская медицинская академия последипломного образования, E-mail: i\_ivakhno@mail.ru.

**Відомості про автора:**

Ивахно И.В., аспирант каф. патологічної анатомії, Харківська медична академія післядипломної освіти, E-mail: i\_ivakhno@mail.ru.

**Information about author:**

Ivakhno I.V., Postgraduate Student, Department of Pathological Anatomy, Kharkiv Medical Academy of Post-Graduate Education, E-mail: i\_ivakhno@mail.ru.

Надійшла в редакцію 25.03.2015 р.



Р. Б. Кондратюк<sup>1</sup>, И. В. Василенко<sup>1</sup>, Ю. К. Гульков<sup>1,2</sup>

## Лектино-гистохимическая оценка углеводных детерминант опухолевых клеток основных гистологических типов рака желудка

<sup>1</sup>Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького,<sup>2</sup>Донецкое областное клиническое территориальное медицинское объединение**Ключевые слова:** рак желудка, лектины.

С целью сопоставить особенности связывания лектинов опухолевыми клетками и клетками слизистой оболочки у больных с разными типами рака желудка изучены 69 гистологических препаратов (31 – диффузного, 25 – кишечного, 13 – смешанного типов рака) с использованием лектинов 8 специфичностей: проростков пшеницы, арахиса, виноградной улитки, бузины черной, бобовника анагирилистного, сои, омелы белой и чечевицы. В диффузном типе максимальная частота высокого связывания обнаружена с лектинами бузины черной (72,4%), виноградной улитки и сои (по 67,7%); в кишечном – с лектинами арахиса (52%) и пшеницы (48%); в смешанном – с лектинами арахиса и сои (по 53,8%). Лектины, обнаруживающие высокую частоту связывания, характеризуются более интенсивным связыванием по сравнению с нормальной слизистой оболочкой. Сопоставлены случаи с инвазией опухолевыми клетками сосудов и без нее. В группе с инвазией преобладала высокая окраска с лектинами улитки и бузины (на 26,4% и 20,2% соответственно) в кишечном; с лектинами бузины черной (68%), виноградной улитки (63%), бобовника анагирилистного (61,5%), чечевицы (57,8%) – в диффузном; с лектинами арахиса, сои (по 53,8%) и пшеницы (42,2%) – в смешанном типе рака желудка. Частота связывания с отдельными лектинами позволяет предполагать, что некоторые углеводные специфичности могут препятствовать инвазии сосудов.

## Лектино-гістохімічне оцінювання вуглеводних детермінант пухлинних клітин основних гістологічних типів раку шлунка

Р. Б. Кондратюк, І. В. Василенко, Ю. К. Гульков

З метою зіставлення особливостей зв'язування лектинів пухлинними клітинами та клітинами слизової оболонки у хворих із різними типами раку шлунка вивчили 69 гістологічних препаратів (31 – дифузного, 25 – кишкового, 13 – змішаного типів раку) з використанням лектинів 8 специфічностей: зав'язі пшениці, арахісу, виноградного равлика, бузини чорної, золотого дощу, сої, омели білої, сочевиці. У дифузному типі максимальну частоту високого зв'язування визначили з лектином бузини чорної (72,4%), виноградного равлика та сої (по 67,7%); у кишковому – з лектинами арахісу (52%) і пшениці (48%); у змішаному – з лектинами арахісу та сої (по 53,8%). Лектини, котрі виявляли високу частоту зв'язування, характеризувались інтенсивнішим зв'язуванням у порівнянні з нормальною слизовою оболонкою. Зіставили випадки з інвазією пухлинними клітинами судин і без неї. У групі з інвазією переважало високе зв'язування з лектинами равлика й бузини (на 26,4% і 20,2% відповідно) в кишковому; з лектинами бузини чорної (68%), виноградного равлика (63%), золотого дощу (61,5%), сочевиці (57,8%) – у дифузному; з лектинами арахісу, сої (по 53,8%) та пшениці (42,2%) – у змішаному типі раку шлунка. Частота зв'язування з окремими лектинами дає можливість припустити, що певні вуглеводні специфічності можуть запобігати інвазії судин.

**Ключові слова:** рак шлунка, лектини.**Патологія.** – 2015. – №1 (33). – С. 73–79

## Lectin-histochemical assessment of carbohydrate determinants in tumour cells of main histological types of gastric cancer

R. B. Kondratiuk, I. V. Vasilenko, Yu. K. Gulkov

Aim. 69 cases of gastric cancer were investigated, among them 31 cases of diffuse type, 25 cases of intestinal and 13 mixed-type, using lectins of eight specificities: wheat germ, peanut, edible snail, common elder, laburnum tree, soybeans, lentils and mistletoe.

Methods and results. Maximum frequency of the high lectin binding was found in the diffuse type for common elder (72.4%), edible snail and soybean lectins (67.7% each). Intestinal type of the gastric cancer was characterized by high rate of tumor cell binding to peanut lectins (52%) and wheat germ lectins (48%). In mixed type – with lectins of peanut and soybeans (53.8% each). Meanwhile lectins exhibiting high binding frequency are characterized by a more intensive binding in comparison with the normal mucosa in the same case. Cases of vascular invasion with tumour cells and without it were compared. In the intestinal type of the gastric cancer the maximum degree of staining difference was with edible snail and common elder lectins with the predominance in the group with invasion (26.4% and 20.2%, respectively). In the diffuse type of the gastric cancer, the highest frequency of intense binding was in the group with invasion with common elder (68%), edible snail (63%), laburnum tree (61.5%), and lentils lectins (57.8%). In the mixed type of the stomach cancer an intensive staining in the presence of vascular invasion was with peanut, soybean (53.8% each) and wheat germs lectins (42.2%).

**Key words:** Stomach Neoplasms, Linitis Plastica, Lectins.**Pathologia.** 2015; №1 (33): 73–79

Гликозилирование – одна из наиболее частых пост-трансляционных модификаций белков, которая регулирует важные биологические особенности и играет ключевую роль во многих патологических процессах,

включая воспаление и опухоли [1,5,10]. Сопоставление локализации рецепторов лектинов арахиса, сои, завязей пшеницы в нормальной молочной железе и ее опухолях позволило установить гетерогенность распределения их

в опухолях, связанное со злокачественностью [4]. Показано, что с помощью лектина виноградной улитки по интенсивности окраски можно различать II и III стадии рака желудка [7]. В наших предыдущих исследованиях, используя 8 лектинов, на 31 случае рака желудка сопоставили особенности муцинов в раках кишечного и диффузного типов, а также их роль в инвазивном росте рака [3].

### Цель работы

Сопоставить особенности связывания 8 лектинов опухолевыми клетками и клетками слизистой оболочки у больных с разными типами рака желудка (кишечный, диффузный, смешанный), а также в случаях с инвазией сосудов и без нее.

### Материалы и методы исследования

Изучено 69 случаев рака желудка, из них 31 случай диффузного типа, 25 кишечного и 13 смешанного типа с использованием лектинов 8 специфичностей: проростков пшеницы (WGA, специфичен к ацетилглюкозамину и N-ацетилнейраминовой (сиаловой) кислоте), арахиса (PNA, специфичен к D-галактозе и галактозамину), виноградной улитки (HPA, специфичен к N-ацетил-D-галактозамину и глюкозе), бузины черной (SNA, специфичен к нейраминовой (сиаловой) кислоте), бобовника анагирилистного (LAL, фукозоспецифичен), сои (SBA, галактозоспецифичен), омелы белой (ML-1, специфичен к галактозамину) и чечевицы (LCA, специфичен к маннозе).

Интенсивность окрашивания лектинами, меченными пероксидазой, оценивали полуколичественно: высокая (+++), умеренная (++) , слабая (+), следовая (±), от-

сутствие связывания (-). Параллельно с опухолевыми клетками оценивали связывание лектинов эпителием слизистой оболочки (покровно-ямочным и железистым).

В дальнейшем группы высокой и умеренной окраски объединили в группу высокой, слабой и следовой – низкой окраски, выделили отсутствие связывания лектинов с их рецепторами. Сопоставили соответствующие показатели среди диффузных раков желудка, раков желудка кишечного и смешанного типов.

Гистологические препараты изучены под светооптическим микроскопом Olympus BX-40, микрофотографирование произведено цифровой фотокамерой Olympus U-TV1X с программным обеспечением Olympus DP-Soft.

Статистическую обработку результатов провели в пакете Medstat с применением базовых методов математической статистики. Статистический анализ показателей, полученных в результате обработки стабิโลграмм, показал, что их распределение отличается от нормального (на уровне  $p < 0,001$ ). В связи с этим в ходе дальнейшего статистического анализа применяли непараметрические критерии. Сравнение двух независимых выборок проведено с использованием критерия Манна – Уитни.

### Результаты и их обсуждение

Результаты сопоставления интенсивности связывания лектинов для диффузных раков желудка, раков желудка кишечного и смешанного типов представлены в *таблице 1*. Приведено количество случаев, имеющих ту или иную выраженность окрашивания для каждого лектина, с вычислением удельного веса степени окраски по отношению к общему числу случаев окраски этим лектином.

Таблица 1

### Сравнительная характеристика интенсивности связывания лектинов в различных типах рака желудка

Интенсивность окраски	WGA	PNA	HPA	SNA	LAL	ML-1	LCA	SBA
	лектин пшеницы – глюкозамин, сиаловые кислоты	лектин арахиса – галактоза, галактозамин	лектин виноградной улитки – галактозамин, глюкоза	лектин бузины черной – сиаловые кислоты	лектин бобовника анагирилистного – фукоза	лектин омелы – галактозамин	лектин чечевицы – манноза, галактоза	лектин сои – галактоза, галактозамин
Диффузный тип рака желудка								
Высокое и умеренное связывание	12 – 38,7%	13 – 43,3%	21 – 67,7%	21 – 72,4%	16 – 63,3%	3 – 10%	10 – 41,7%	15 – 67,7%
Низкое связывание и его отсутствие	19 – 61,3%	17 – 56,7%	10 – 32,3%	8 – 27,6%	14 – 46,7%	27 – 90%	14 – 58,3%	11 – 42,3%
Всего	31	30	31	29	30	30	24	26
Кишечный тип рака желудка								
Высокое и умеренное связывание	12 – 48%	13 – 52%	8 – 32%	8 – 32%	10 – 40%	4 – 19%	3 – 17,6%	9 – 42,9%
Низкое связывание и его отсутствие	13 – 52%	12 – 48%	17 – 68%	17 – 68%	15 – 60%	17 – 81%	14 – 82,4%	12 – 57,1%
Всего	25	25	25	25	25	21	17	21
Смешанный тип рака желудка								
Высокое и умеренное связывание	6 – 42,2%	7 – 53,8%	5 – 38,5%	5 – 38,5%	4 – 30,8%	–	4 – 30,8%	7 – 53,8%
Низкое связывание и его отсутствие	7 – 53,8%	6 – 46,2%	8 – 61,5%	8 – 61,5%	9 – 69,2%	11 – 100%	9 – 69,2%	6 – 46,2%
Всего	13	13	13	13	13	11	13	13

Максимальный удельный вес случаев с высоким и умеренным связыванием с опухолевыми клетками в диффузном раке обнаружен с лектином бузины черной (72,4%), специфичным к сиаловой кислоте (рис. 1). В кишечном типе рака желудка максимальная частота высокого связывания отмечена с лектином арахиса (52%), специфичного к галактозе и галактозамину (рис. 2). В смешанном типе рака желудка высокое и умеренное связывание с опухолевыми клетками также установлено с лектинами арахиса и сои (по 53,8%), специфичными к галактозе и галактозамину.

На втором месте по частоте высокого и умеренного связывания в диффузном типе рака желудка стоят лектины виноградной улитки (рис. 3) и сои, специфичные к галактозамину и галактозе (по 67,7%); в кишечном и смешанном типах рака желудка – лектин проростков пшеницы, специфичный к глюкозамину и сиаловым кислотам (48% и 42,2% соответственно) (рис. 4).

На третьем месте по частоте высокого связывания в диффузном раке желудка находится лектин бобовника анагирилистного (63,3%) (рис. 5), специфичного к фукозе; кишечном типе – лектин сои (42,9%), специфичный к галактозе и галактозамину; смешанном типе – лектины виноградной улитки (рис. 6) и бузины черной (по 38,5%), специфичные к глюкозе, галактозамину и сиаловым кислотам соответственно.

Минимальная частота высокого связывания в диффузном раке – с лектином омелы (10%), в кишечном

типе – с лектином чечевицы (17,6%); в смешанном типе рака желудка высокое связывание с лектином омелы отсутствовало.

Такая же полуколичественная оценка с аналогичной градацией проведена в тех же случаях в сопоставлении со связыванием лектинов в нормальной (неопухолевой) слизистой оболочке желудка, ее покровно-ямочным эпителием, эпителием пилорических и фундальных желез, учитывая максимальную выраженность в этих клетках. При сравнении выделены 3 градации: примерно равная выраженность связывания каждого лектина, большая или меньшая в опухолевых клетках по сравнению с эпителием нормальной слизистой оболочки. Результаты представлены в таблице 2.

Эти данные представляют большой интерес. Клетки слизистой оболочки и в нормальном состоянии продуцируют муцин разного состава, что определяет связывание с ними лектинов. В процессе предраковых изменений и малигнизации клетки могут терять ряд углеводных детерминант в сходных или различающихся типах рака. Это относится в основном к галактозоспецифичным лектинам виноградной улитки, арахиса и сои в диффузном типе рака желудка (48%, 50% и 52,4% соответственно). Минимальной в этом типе рака была частота снижения связывания лектина бузины черной (18,2%). В раке кишечного типа снижение связывания лектина бузины черной в опухолевых клетках по сравнению с нормальной слизистой оболочкой было максимальным (65%) по

Таблица 2

Сопоставление интенсивности связывания лектинов опухолевыми клетками и эпителием слизистой оболочки в разных типах рака желудка

Соотношение связывания опухолевыми клетками и клетками слизистой оболочки	WGA	PNA	HPA	SNA	LAL	SBA	ML-1	LCA
	лектин пшеницы – глюкозамин, сиаловые кислоты	лектин арахиса – галактоза, галактозамин	лектин виноградной улитки – галактозамин, глюкоза	лектин бузины черной – сиаловые кислоты	лектин бобовника анагирилистного – фукоза	лектин сои – галактоза, галактозамин	лектин омелы – галактозамин	лектин чечевицы – манноза, галактоза
Диффузный тип рака желудка								
В ОК больше, чем в СОЖ	8 – 32%	4 – 15,4%	6 – 24%	13 – 59,1%	9 – 39,15%	4 – 19%	6 – 27,3%	6 – 31,6%
Равное связывание	6 – 24%	9 – 34,6%	7 – 28%	5 – 22,7%	3 – 13,05%	6 – 28,6%	9 – 40,9%	7 – 36,8%
В ОК меньше, чем в СОЖ	11 – 44%	13 – 50%	12 – 48%	4 – 18,2%	11 – 47,8%	11 – 52,4%	7 – 31,8%	6 – 31,6%
Всего	25	26	25	22	23	21	22	19
Кишечный тип рака желудка								
В ОК больше, чем в СОЖ	7 – 36,85%	10 – 41,7%	6 – 31,6%	4 – 20%	4 – 23,5%	8 – 47,1%	7 – 38,9%	7 – 43,75%
Равное связывание	5 – 26,3%	3 – 12,5%	5 – 26,3%	3 – 15%	5 – 29,4%	3 – 17,6%	5 – 27,8%	7 – 43,75%
В ОК меньше, чем в СОЖ	7 – 36,85%	11 – 45,8%	8 – 42,1%	13 – 65%	8 – 47,1%	6 – 35,3%	6 – 33,3%	2 – 12,5%
Всего	19	24	19	20	17	17	18	16
Смешанный тип рака желудка								
В ОК больше, чем в СОЖ	4 – 33,3%	3 – 21,4%	7 – 50%	3 – 27,3%	3 – 27,3%	5 – 45,4%	4 – 40%	6 – 40%
Равное связывание	4 – 33,3%	5 – 35,7%	1 – 7,1%	3 – 27,3%	3 – 27,3%	4 – 36,4%	2 – 20%	3 – 20%
В ОК меньше, чем в СОЖ	4 – 33,3%	6 – 42,9%	6 – 42,9%	5 – 45,4%	5 – 45,4%	2 – 18,2%	4 – 40%	6 – 40%
Всего	12	14	14	11	11	11	10	15

сравнению с другими лектинами, а минимальным – с лектином чечевицы (12,5%). В смешанном типе рака желудка максимальное снижение экспрессии углеводных детерминант отмечено с лектинами бузины черной и бобовника (по 45,4%) (рис. 7), минимальное – лектином сои (18,2%).

С другой стороны, ряд углеводных специфичностей возрастает в опухолевых клетках по сравнению со слизистой оболочкой. В диффузном типе рака желудка это установлено с лектином бузины черной (59,1%) и бобовника анагирилистного (39,15%); в кишечном типе – с лектином сои (47,1%), чечевицы (43,75%) и арахиса (41,7%); в смешанном типе – с лектином виноградной улитки (50%) и сои (45,4%).

Как и следовало предполагать, лектин, обнаруживающий высокую частоту интенсивного связывания, характеризуется высокой частотой возрастания в опухоли по сравнению со слизистой оболочкой. Низкое связывание в опухоли сочетается со снижением в опухоли по сравнению со слизистой оболочкой. Результаты сопоставления связывания лектинов опухолевыми клетками в случаях с инвазией сосудов и без инвазии представлены в таблице 3.

При кишечном типе рака желудка группа без инвазии сосудов составила 9 случаев и показала максимальное связывание с лектинами пшеницы (43,8%), улитки (37,5%). Максимальные различия степени выраженности окраски были с лектинами улитки и бузины с преобладанием в группе с инвазией (на 26,4% и 20,2% соответственно), т.е. эти лектины статистически достоверно способствуют инвазии ( $p < 0,01$ ), лектинами бобовника анагирилистного (рис. 8), сои в группе без инвазии (по 13,1%), т.е. эти лектины препятствуют инвазии.

В раке желудка диффузного типа инвазии сосудов не было только в 4 случаях из 31 (12,9%). Поэтому при этом типе рака, учитывая особенность нашего материала, анализировали, главным образом, частоту высокого связывания лектинов в группе с инвазией, сравнивая

группу без инвазии в отдельных случаях.

В диффузном типе рака желудка наиболее высокая частота интенсивного связывания в группе с инвазией была с лектинами бузины черной (68%), виноградной улитки (63%), бобовника анагирилистного (61,5%), чечевицы (57,8%), т.е. углеводные детерминанты, обнаруживаемые этими лектинами, способствуют инвазии.

В смешанном типе рака желудка не было инвазии сосудов только в 1 случае из 13 (7,7%), поэтому сопоставление не проводили. Однако высокое окрашивание при наличии инвазии сосудов было с лектинами арахиса, сои (по 53,8%) и пшеницы (42,2%).

Высокая частота интенсивного связывания в диффузном типе близка к таковой в кишечном типе рака желудка с лектином проростков пшеницы, возможно, потому, что он обладает двойной специфичностью, в том числе к сиаловым кислотам.

Полученные данные позволяют говорить о роли углеводных специфичностей в развитии и прогрессии рака желудка, в частности, приобретении инвазивности. Однако в разных типах рака желудка их характер значительно отличается и даже может быть противоположным.

В первую очередь это относится к лектину бузины черной (SNA), максимально связывающемуся с опухолевыми клетками диффузного типа рака желудка и часто возрастающему в опухолевых клетках по сравнению с нормальной слизистой оболочкой в нашем материале. В кишечном типе рака желудка лектин бузины черной связывался с опухолевыми клетками с высокой интенсивностью более чем в два раза реже, нежели в диффузном. Максимально часто снижался в опухоли по сравнению с нормальной слизистой оболочкой желудка. Смешанный тип рака желудка занимает в этом отношении промежуточное положение между диффузным и кишечным типами (несколько ближе к кишечному, табл. 1, 2).

В кишечном типе рака желудка высокая интенсивность окраски с максимальной частотой отмечена с лектином арахиса (52%), специфичным для галактозы

Таблица 3

**Сопоставление высокой интенсивности связывания лектинов в зависимости от наличия инвазии сосудов опухолевыми клетками**

Соотношение связывания опухолевыми клетками и клетками слизистой оболочки	WGA лектин пшеницы – глюкозамин, сиаловые кислоты	PNA лектин арахиса – галактоза, галактозамин	HPA лектин виноградной улитки – галактозамин, глюкоза	SNA лектин бузины черной – сиаловые кислоты	LAL лектин бобовника анагирилистного – фукоза	SBA лектин сои – галактоза, галактозамин	ML-1 лектин омелы – галактозамин	LCA лектин чечевицы – манноза, галактоза
<b>Диффузный тип рака желудка</b>								
с инвазией	11/27 – 40,7%	10/27 – 37%	17/27 – 63%	17/25 – 68%	16/26 – 61,5%	11/22 – 50%	0/26 – 0%	15/26 – 57,7%
без инвазии	1/4 – 25%	3/3 – 100%	4/4 – 100%	4/4 – 100%	0/4 – 0%	4/4 – 100%	3/4 – 75%	-
отличие	15,7%	-63%	-37%	-32%	61,5%	-50%	-75%	
<b>Кишечный тип рака желудка</b>								
с инвазией	7/16 – 43,8%	4/16 – 25%	6/16 – 37,5%	5/16 – 31,3%	5/16 – 31,3%	5/16 – 31,3%	4/16 – 25%	1/16 – 6,3%
без инвазии	3/9 – 33,3%	3/9 – 33,3%	1/9 – 11,1%	1/9 – 11,1%	4/9 – 44,4%	4/9 – 44,4%	1/9 – 11,1%	-
отличие	10,5%	-8,3%	26,4%	20,2%	-13,1%	-13,1%	13,9%	6,3%
<b>Смешанный тип рака желудка</b>								
с инвазией	6/13 – 42,2%	7/13 – 53,8%	5/13 – 38,5%	5/16 – 31,3%	4/16 – 25%	7/13 – 53,8%	-	4 – 30,8%

и галактозамина. Высокая частота интенсивной окраски была и с лектином сои (42,9%), также связывающимся с галактозой и галактозамином. В диффузном типе рака желудка высокая интенсивность окраски с галактозоспецифическими лектинами установлена с меньшей частотой: арахиса – 43,3%, омелы – 10%, чечевицы – 41,7%.

В последнее время широкое изучение лектина бузины черной (SNA I) показало его уникальное связывание с глюкоконъюгатами сиаловой кислоты [13]. Обосновано распознавание SNA I лектином раково-ассоциированного сиалил-Tn (STn) антигена, позволяющего в образцах сыворотки отличать рак и здоровое состояние [14].

Обнаружено связывание SNA с высокой частотой (66,7%) с аденокарциномой желчного пузыря, тогда как при хроническом холецистите частота связывания составляет 11,4%. Показано, что возрастание связывания SNA является независимым прогностическим предсказателем аденокарциномы желчного пузыря [16]. Аналогичные особенности установлены при раке молочной железы, когда экспрессия SNA возрастала в зависимости от стадии опухоли [6]; при экспрессии SNA в опухолевых клетках отмечен плохой прогноз, более низкое 5-летнее выживание по сравнению со случаями с негативным SNA [8]. Исследование экспрессии SNA в доброкачественных и злокачественных поражениях желудка установило более высокое связывание ее в ткани рака желудка, чем в околоопухолевой ткани и доброкачественных поражениях. Хотя не было различий между первичной опухолью и метастазами, связывание зависело от стадии рака (глубины инвазии, наличия метастазов в лимфатические узлы) [17]. Возрастание сиализации клеточной поверхности обнаружено в раке толстой кишки и коррелирует с инвазивным и метастатическим ростом опухолевых клеток [12].

Высокий метастатический потенциал опухолей с гиперсиализацией объясняют тем, что эти клетки не распознаются системой мононуклеарных фагоцитов и могут долго циркулировать в крови и лимфе.

Однако лектино-гистохимическое исследование дуоденальных желез различных млекопитающих показало, что в низкодифференцированных клетках эпителия была высокая экспрессия N-ацетил-D-галактозамина, обнаруживаемого лектином сои. В более дифференцированных клетках отмечены остатки D-галактозы (дающей связывание с лектином арахиса), а также фукозы (с лектином бобовника анагирилистного LAL), N-ацетил-глюкозамина и сиаловой кислоты (с лектином проростков пшеницы WGA).

Показано, что в незрелых клетках костного мозга только часть терминальных остатков галактозы экранирована сиаловой кислотой (поэтому есть связывание с PNA). В процессе созревания происходит сиалирование поверхностных гликопротеинов и потеря связывания с лектином арахиса [1].

Сиалосвязывающие или галактозосвязывающие лектины способны «чувствовать» и по-разному распознавать в гликанах маскированную сиаловой кислотой

галактозную группу. Отмечена сложная специфичность к конфигурациям углеводов в глюкоконъюгатах.

Многие лектины (арахиса, сои, виноградной улитки, омелы) связываются с галактозамином и галактозой (галактозамин вдвое активнее галактозы) [1]. Лектин арахиса обнаруживает T-антиген, раково-ассоциированный и имеющий диагностическое значение [9], может быть маркером метастатических потенциалов злокачественных опухолей. В незрелых клетках только часть терминальных остатков галактозы может быть экранирована сиаловой кислотой, такое экранирование происходит в процессе созревания клеток. Тогда, например, сиалированный галактозамин почти не взаимодействует с лектином сои и другими галактозаминспецифическими лектинами, теряет аффинность ко многим опухолевым клеткам [1].

Исходя из этого, можно предполагать, что случаи с высокой специфичностью к галактозе, галактозамину характеризуются низкой зрелостью опухолевых клеток, а высокая аффинность к сиаловым кислотам (лектин бузины черной, в меньшей степени лектин проростков пшеницы) свидетельствуют о большей зрелости опухолевых клеток. Вместе с тем опубликованы данные, что sialyl-Lewis-x в раке желудка человека коррелирует с метастазированием [15].

Тем не менее, в специализированной литературе, касающейся роли сиаловой кислоты в оценке злокачественности рака желудка, не выделяют его типы (кишечный, диффузный и смешанный), которые существенно отличаются.

В нашем исследовании установлены существенные различия типов рака желудка и в отношении содержания сиаловых кислот в этих типах опухоли. Так, если в диффузном типе рака желудка частота интенсивного связывания опухолевыми клетками лектина бузины черной была максимальной и равнялась или превышала нормальную слизистую оболочку, то в кишечном типе она была минимальной, в большинстве случаев ниже в опухоли, чем в нормальной слизистой оболочке.

Складывается кажущееся противоречие о роли лектинов в оценке злокачественности опухолей. С одной стороны, указана роль сиаловых кислот, фукозы в качестве показателя злокачественности, что подтверждается в диффузном раке желудка с максимальной инвазивностью. С другой стороны, фукозоспецифический лектин бобовника анагирилистного, галактозо-, галактозаминспецифические лектины арахиса и сои в кишечном типе рака желудка с большей частотой отмечают в случаях без инвазии сосудов. По данным специализированной литературы, галактозоспецифические лектины служат показателем незрелости клеток, а сиалирование и фукозилирование появляется в более дифференцированных клетках при их созревании.

Противоречие разрешается при учете, что диффузный и кишечный типы рака желудка резко отличаются по многим особенностям канцерогенеза и прогрессии.

Так, развитие диффузного рака желудка связано с

нарушением клеточной адгезии в связи с мутацией E-кадгерина (как результат наследственной предрасположенности или спорадической мутации). Это ведет к развитию перстневидноклеточного рака с низким ядерно-цитоплазматическим соотношением, высокой продукцией муцина, слабой пролиферативной активностью. Нарушение клеточной адгезии из-за потери E-кадгерина – первый шаг эпителиально-мезенхимального перехода, для которого характерно резкое возрастание инвазии клеток и снижение их пролиферации [11]. Связь клеток в эпителиальных опухолях кроме E-кадгерина определяется также плотными соединениями. Показано, что лектин сои в диффузном раке желудка связывался с высокой частотой, снижая белки плотных соединений.

Рак кишечного типа, развивающийся в результате действия онкогенов (CagA антиген хеликобактерной инфекции и др.), характеризуется высокой пролиферативной активностью и выраженной незрелостью клеток.

Понятно, что в раке диффузного типа с более зрелыми перстневидными клетками будут выражены процессы сиализации и фукозилирования с максимальной инвазивностью – как следствие эпителиально-мезенхимального перехода.

В раке кишечного типа клетки сохраняют высокую степень незрелости с преобладанием галактозы, галактозамина и меньшую инвазивность в сравнении с диффузным типом рака.

Таким образом, разные типы рака желудка характеризуются различным углеводным детерминантом опухолевых клеток, что может иметь значение для создания различных потенциалов к их метастазированию и, возможно, других особенностей.

Диффузный тип рака желудка с точки зрения классических представлений о клеточном атипизме характеризуется в очагах перстневидноклеточного рака низким ядерно-цитоплазматическим отношением, высокой продукцией муцина, т.е. высокой степенью дифференцировки, в том числе функциональной, низкой пролиферативной активностью. Это соответствует представлению о связи сиализации с созреванием, дифференцированием эпителиальных клеток.

Кишечный тип рака желудка характеризуется выраженностью клеточного атипизма, высоким ядерно-цитоплазматическим отношением и пролиферативной активностью, т.е. выражены признаки незрелости клеток, что соответствует большей частоте высокого связывания с галактозоспецифическими лектинами.  $\alpha$ -галактоза – углеводный эпитоп опухоли-ассоциированного Tomsen-Friedenreich и Tn антигенов.

Однако степень зрелости, дифференцировки опухолевых клеток может не отражать их инвазивность, которая часто связана, например, с развитием эпителиально-мезенхимальной трансформации (перехода) [11], которая по частоте, распространенности и полноте выше в раке

диффузного типа [2]. Один из основных признаков эпителиально-мезенхимальной трансформации – обособление опухолевых клеток, потеря характерной для эпителия связи клеток друг с другом. В этом плане особый интерес представляет лектин сои, который редуцирует уровень белков плотных соединений (окклюдин, клаудин 3) и этим способствует нарушению целостности эпителиального пласта. В нашем материале лектин сои интенсивно связывался с высокой частотой во всех типах рака желудка: максимально в диффузном типе (67,7%), реже в смешанном (53,8%) и кишечном (42,9%) типах.

#### Выводы

1. Типы рака желудка (диффузный, кишечный и смешанный) отличаются различной частотой высокого и умеренного связывания отдельных лектинов опухолевыми клетками. В диффузном типе максимальная частота высокого связывания обнаружена с лектином бузины (сиалоспецифичный – 72,4%), лектинами виноградной улитки и сои (галактозамин-, галактозоспецифичные – по 67,7%). Кишечный тип рака желудка характеризовался высокой частотой связывания опухолевых клеток с лектинами арахиса (галактозо- и галактозаминспецифичный – 52%) и пшеницы (глюкозамин-, сиалоспецифичный – 48%). В смешанном типе рака желудка чаще высокая интенсивность связывания опухолевых клеток была с галактозоспецифичными лектинами арахиса и сои (по 53,8%). Частота высокого связывания лектинов в разных типах рака отличалась статистически достоверно ( $p < 0,01$ ).

2. Сопоставление частоты высокого связывания лектинов с опухолевыми клетками и эпителием слизистой оболочки в том же случае показало 3 варианта: в опухолевых клетках частота связывания каждого лектина была примерно равна связыванию с эпителием слизистой оболочки, выше и ниже ее. При этом лектины, обнаруживающие высокую частоту связывания, характеризуются более интенсивным связыванием по сравнению со слизистой оболочкой.

3. Сравнение лектинных специфичностей в случаях с инвазией сосудов и без нее показало максимальную частоту в диффузном типе рака желудка с инвазией для лектина бузины черной, но она отмечена и в случаях без инвазии, тогда как лектин бобовника анагирилистного связывался с опухолевыми клетками только в случаях с инвазией сосудов. В раке кишечного типа максимальная частота связывания в группе с инвазией сосудов отмечена с лектином проростков пшеницы, но она была только на 10% ниже в группе без инвазии сосудов, более значительное различие было с лектином виноградной улитки (26,4%). Частота связывания с отдельными лектинами позволяет предполагать, что отдельные углеводные специфичности могут препятствовать инвазии сосудов: обнаруживаемые лектинами бобовника анагирилистного и сои для кишечного типа рака, омелы – для диффузного.

#### Список литературы

1. Антонюк В.О. Лектини та їх сировинні джерела / В.О. Антонюк. – Л., 2005. 554 с.
2. Последовательность появления отдельных признаков эпителиально-мезенхимальной трансформации в основных гистологических типах рака желудка / И.В. Василенко, Б.Б. Брук, Р.Б. Кондратюк и др. // Український медичний альманах. – 2013. – Т. 16. – №3 (додаток). – С. 49–53.
3. Роль углеводных детерминант в инвазивном раке желудка / И.В. Василенко, Н.Н. Сургай, Ю.М. Винников и др. // Вісник проблем біології і медицини. – 2003. – №1. – С. 102–106.
4. Луцик А.Д. Рецепторы лектинов в молочной железе и её опухолях / А.Д. Луцик, В.В. Биров, И.М. Дмитрук // Архив патологии. – 1986. – №7. – С. 9–14.
5. Луцик А.Д. Лектины в гистохимии / А.Д. Луцик, Е.С. Денюк, М.Д. Луцик. – Львов, 1989. – 144 с.

6. Пашченко С.М. Визначення в пухлині хворих на карциному молочної залози рецепторів до лектину SNL / С.М. Пашченко // Одеський медичний журнал. – 2002. – №1. – С. 50–53.
7. Arab M.R. Lectin histochemical study of cell surface glycoconjugate in gastric carcinoma / M.R. Arab, S. Salari, M. Karimi, H. Mofidpour // *Acta Med Iran*. – 2010. – Vol. 48. – №4. – P. 209–213.
8. Chen G. Expression of galectin-3 and Sambucus nigra agglutinin and its clinicopathological significance in benign and malignant lesions of breast / G. Chen, Q. Zou, Z. Yang // *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. – 2010. – Vol. 35. – №6. – P. 584–589.
9. Expression of peanut agglutinin-binding mucin-type glycoprotein in humar eosophageal squamous cell carcinoma as a marker / S. Kannan, R.A. Lakku, D. Niranjali // *Mol Cancer*. – 2003. – Vol. 2. – №1. – P. 38.
10. Characterization of wheat germ agglutinin lectin-reactive glycosylated OmpA-like proteins derived from *Porphyromonas gingivalis* / Y. Murakami, Y. Hasegawa, K. Nagano, F. Yoshimura // *Infect Immun*. – 2014. – Vol. 82. – №11. – P. 4563–4571.
11. Nieto M.A. The SNAIL superfamily of zinc – finger transcription factors / M.A. Nieto // *Molecular cell biology*. – 2002. – Vol. 3. – P. 155–166.
12. Expression of alpha 2,6-linked sialic acid residues in neoplastic but not in normal human colonic mucosa. A lectin-gold cytochemical study with *Sambucus nigra* and *Maackia amurensis* lectins / T. Sata, J. Roth, C. Zuber et al. // *Am J Pathol*. – 1991. – Vol. 139. – №6. – P. 1435–1448.
13. Shang C. Comparative analysis of carbohydrate binding properties of *Sambucus nigra* lectins and ribosome-inactivating proteins / C. Shang, E.J. Van Damme // *Glycoconjug J*. – 2014. – Vol. 31. – №5. – P. 345–354.
14. Construction and validation of a *Sambucus nigra* biosensor for cancer-associated STn antigen / M.L. Silva, E. Gutiérrez, J.A. Rodríguez // *Biosens Bioelectron*. – 2014. – Vol. 57. – P. 254–261.
15. Close correlation between increased sialyl-Lewis-x expression and metastasis in human gastric carcinoma / H. Ura, R. Denno, K. Hirata et al. // *World J Surg*. – 1997. – Vol. 21. – №7. – P. 773–776.
16. Up-regulation of galectin-3 and *Sambucus nigra* agglutinin binding site is associated with invasion, metastasis and poor-progression of the gallbladder adenocarcinoma / L.P. Yang, S. Jiang, J.Q. Liu et al. // *Hepatogastroenterology*. – 2012. – Vol. 59. – P. 2089–2094.
17. Expression of galectin 3 and *Sambucus nigra* agglutinin and their clinicopathological significance in benign and malignant lesions of stomach / J.P. Zhou, Z.L. Yang, D.C. Liu, J.P. Zhou // *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi*. – 2009. – Vol. 12. – №3. – P. 297–300.
18. uglevodnykh determinant v invazivnom rake zheludka [Role of the submucosous determinant in invasion growth of a crawfish of a stomach]. *Visnyk problem biologii i medycyny*, 1, 102–106. [in Ukrainian].
19. Lucik, A. D., Bиров, V. V., & Dmitruk, I. M. (1986) [Lectin's receptors in the breast and its carcinoma]. *Arkhiv patologii*, 7, 9–14. [in Russian].
20. Lucik, A. D., Detyuk, A. D., Lucik, M. D. (1989) *Lektyny v gistokhimii [Lectins in histochemistry]*. Lvov. [in Ukrainian].
21. Pashchenko, S. M. (2002) Vyznachennia v pukhlyni khvorykh na kartsynomu molochnoi zalozy retseptoriv do lektynu SNL [Detection receptors of the lectin SNL in breast cancer]. *Odeskyi medychnyi zhurnal*, 1, 50–53.
22. Arab, M. R., Salari, S., Karimi, M., & Mofidpour, H. (2010) Lectin histochemical study of cell surface glycoconjugate in gastric carcinoma using helix pomatia agglutinin. *Acta Med Iran*, 48(4), 209–213.
23. Chen, G., Zou, Q., & Yang, Z. (2010) Expression of galectin-3 and *Sambucus nigra* agglutinin and its clinicopathological significance in benign and malignant lesions of breast. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 35(6), 584–589. doi: 10.3969/j.issn.1672-7347.2010.06.008.
24. Kannan, S., Lakku, R. A., Niranjali, D., Jayakumo, K., Steven, A. H., Taralakshmi, V. V., et al. (2003) Expression of peanut agglutinin-binding mucin-type glycoprotein in humar eosophageal squamous cell carcinoma as a marker. *Mol Cancer*, 2(1), 38. doi:10.1186/1476-4598-2-38.
25. Murakami, Y., Hasegawa, Y., Nagano, K., & Yoshimura, F. (2014) Characterization of wheat germ agglutinin lectin-reactive glycosylated OmpA-like proteins derived from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*, 82(11), 4563–4571. doi: 10.1128/IAI.02069-14. E
26. Nieto, M. A. (2002) The SNAIL superfamily of zinc – finger transcription factors. *Molecular cell biology*, 3, 155–166. doi:10.1038/nrm757.
27. Sata, T., Roth, J., Zuber, C., Stamm, B., & Heitz, P.U. (1991) Expression of alpha 2,6-linked sialic acid residues in neoplastic but not in normal human colonic mucosa. A lectin-gold cytochemical study with *Sambucus nigra* and *Maackia amurensis* lectins. *Am J Pathol*, 139(6), 1435–1448.
28. Shang, C., & Van Damme, E. J. (2014) Comparative analysis of carbohydrate binding properties of *Sambucus nigra* lectins and ribosome-inactivating proteins. *Glycoconjug J*, 31(5), 345–354. doi: 10.1007/s10719-014-9527-9.
29. Silva, M. L., Gutiérrez, E., Rodríguez, J. A., Gomes, C., & David, L. (2014) Construction and validation of a *Sambucus nigra* biosensor for cancer-associated STn antigen. *Biosens Bioelectron*, 57, 254–261. doi: 10.1016/j.bios.2014.02.006.
30. Ura, H., Denno, R., Hirata, K., Yamaguchi, K., Yasoshima, T., & Shishido, T. (1997) Close correlation between increased sialyl-Lewis-x expression and metastasis in human gastric carcinoma. *World J Surg*, 21(7), 773–776.
31. Yang, L. P., Jiang, S., Liu, J. Q., Miao, X. Y., & Yang, Z. L. (2012) Up-regulation of galectin-3 and *Sambucus nigra* agglutinin binding site is associated with invasion, metastasis and poor-progression of the gallbladder adenocarcinoma. *Hepatogastroenterology*, 59(119), 2089–2094.
32. Zhou, J. P., Yang, Z. L., Liu, D. C., & Zhou, J. P. (2009) Expression of galectin 3 and *Sambucus nigra* agglutinin and their clinicopathological significance in benign and malignant lesions of stomach. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi*, 12(3), 297–300.

## References

1. Antoniuk, V. O. (2005) *Lectyny ta ikh syrovynni dzerhela [Lectins and its charge spring]*. Lviv. [in Ukrainian].
2. Vasilenko, I. V., Bruk, B. B., Kondratyuk, R. B., Gul'kov, Yu. K., & Surgaj, N. N. (2013) Posledovatel'nost' povyleniya otdel'nykh priznakov e'pitelial'no-mezenkhimal'noj transformacii v osnovnykh gistologicheskikh tipakh raka zheludka [The sequence of appearance of certain signs of epithelial-mesenchymal transition of the main histological types of gastric cancer]. *Ukrainskyi medychnyi almanakh*, 3, 49–53. [in Ukrainian].
3. Vasilenko, I. V., Surgaj, N. N., Vinnikov, Yu. M., Gul'kov, Yu. K., Dyadyk, E. M., Kurennaya, S. S., et al. (2003) Rol'

## Сведения об авторах:

Кондратюк Р.Б., к. мед. н., доцент каф. патоморфологии, Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького, E-mail: rbkondrat@gmail.com.

Василенко И.В., д. мед. н., профессор, зав. каф. патоморфологии, Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького. Гульков Ю.К., к. мед. н., ассистент каф. патоморфологии, Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького, зав. патологоанатомическим отделением, Донецкое областное клиническое территориальное медицинское объединение.

## Відомості про авторів:

Кондратюк Р.Б., к. мед. н., доцент каф. патоморфології, Донецький національний медичний університет ім. М. Горького, E-mail: rbkondrat@gmail.com.

Василенко І.В., д. мед. н., професор, зав. каф. патоморфології, Донецький національний медичний університет ім. М. Горького.

Гульков Ю.К., к. мед. н., асистент каф. патоморфології, Донецький національний медичний університет ім. М. Горького, зав. патологоанатомічного відділення, Донецьке обласне клінічне територіальне медичне об'єднання.

## Information about author:

Kondratyuk R.B., MD, PhD, Associate Professor of Pathomorphology Department, M. Gorky Donetsk National Medical University, E-mail: rbkondrat@gmail.com.

Vasilenko I.V., MD, PhD, DSci, Professor, Head of Pathomorphology Department, M. Gorky Donetsk National Medical University.

Gul'kov Yu.K., MD, PhD, Assistant of Pathomorphology Department, M. Gorky Donetsk National Medical University.

Надійшла в редакцію 01.04.2015 р.

М. Р. Герасимчук

## Прояви експериментального гіпотиреозу при дії помірного фізичного навантаження

ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет»

**Ключові слова:** гіпотиреоз, помірне фізичне навантаження, ендогенна інтоксикація.

Гіпотиреоз супроводжується порушеннями гормонального гомеостазу, зменшенням рухової активності, збільшенням маси тіла і, як наслідок, змінами якості життя. З метою вивчення ефекту помірного фізичного навантаження на прояви експериментального гіпотиреозу в 74 самок білих щурів лінії Вистар оцінили зміни маси тіла та стан ендогенної інтоксикації за допомогою визначення молекул середньої маси та лактату. Встановили, що у тварин із гіпотиреозом маса тіла збільшувалась більше ніж на 25% ( $p < 0,05$ ), рівень молекул середньої маси у крові – на 19,44% ( $p < 0,05$ ), у печінці та легенях – на 16,63% та 39,71% відповідно, а лактату – в 6,8 раз. При гіпотиреозі та помірному фізичному навантаженні наростання ендотоксемії відбувалось повільніше і на значно нижчому рівні. Це свідчить, що при гіпотиреозі виникає стан ендогенної інтоксикації, що зумовлений інтенсифікацією процесів утворення молекул середньої маси й лактату. Доведено позитивний вплив помірних фізичних навантажень, що проявлявся у зменшенні ознак основного симптомокомплексу гіпотиреозу.

### Проявления экспериментального гипотиреоза при действии умеренной физической нагрузки

М. Р. Герасимчук

Гипотиреоз сопровождается нарушениями гормонального гомеостаза, уменьшением двигательной активности, ростом массы тела и, как следствие, изменениями качества жизни. С целью изучения эффекта умеренной физической нагрузки на проявления экспериментального гипотиреоза у 74 самок белых крыс линии Вистар оценены изменения массы тела и состояние эндогенной интоксикации посредством определения молекул средней массы и лактата. Установлено, что у животных с гипотиреозом масса тела возросла более чем на 25% ( $p < 0,05$ ), уровень молекул средней массы в крови – на 19,44% ( $p < 0,05$ ), в печени и легких – на 16,63% и 39,71% соответственно, а лактата – в 6,8 раз. При гипотиреозе и умеренных физических нагрузках нарастание эндотоксемии происходило медленнее и на более низком уровне. Это свидетельствует, что при гипотиреозе возникает состояние эндогенной интоксикации, обусловленное интенсификацией процессов образования молекул средней массы и лактата. Доказано положительное влияние умеренных физических нагрузок, что проявлялось в уменьшении признаков основного симптомокомплекса гипотиреоза.

**Ключевые слова:** гипотиреоз, умеренная физическая нагрузка, эндогенная интоксикация.**Патология.** – 2015. – №1 (33). – С. 80–83

### Manifestations of experimental hypothyroidism during the influence of moderate physical activity

М. Р. Герасимчук

Hypothyroidism (HP) is accompanied by hormonal homeostasis, decreased motor activity, increased body mass and, consequently, changes in the quality of life.

Aim. To study the effect of moderate physical activity (MPA) on experimental manifestations of HP.

Methods and results. 74 female Wistar rats were assessed for the changes in body weight (BW) and the state of endogenous intoxication (EI) by determining the average of middle molecular weight peptides (MMWP) and lactate (LT). It was found in animals with hypothyroidism, BW increased by more than 25% ( $p < 0,05$ ), MMWP level in the blood increased by 19,44% ( $p < 0,05$ ), as well as in the major organs of detoxification (liver and lungs) to 16,63% and 39,71% respectively, while LT – 6,8 times. In case of experimental HP combined with MPA, elevation of endotoxemia was slower and at a much lower level.

Conclusions. This indicates that in case of hypothyroidism, a state of EI is developed due to the intensification of the processes of formation of MMWP and LT. MPA proved to have a positive effect, resulting in a decrease of symptoms expressing HP.

**Key words:** Hypothyroidism, Exercise, Endotoxemia.**Pathologia.** 2015; №1 (33): 80–83

Однією з найбільш поширених ендокринних патологій є порушення функцій щитовидної залози (ЩЗ). Значна кількість радіонуклідів, які потрапили у довкілля в результаті аварії на Чорнобильській АЕС, спричинили зовнішнє та внутрішнє опромінення організму багатьох людей, визначили формування певних доз опромінення і розвиток низки патологічних станів, зокрема гіпотиреозу (ГЗ). За даними епідеміологічних досліджень, в окремих групах населення поширеність гіпотиреозу досягає 10–12%: серед немовлят – 0,025%

(1:4000), а серед старших за 65 років – 2–4%. Захворюванню притаманні дві основні закономірності: 1) у жінок гіпотиреоз діагностують значно частіше, ніж у чоловіків; 2) частота гіпотиреозу зростає зі збільшенням віку. Загальна поширеність клінічного гіпотиреозу в популяції становить 0,2–2,0% [1, 2].

Актуальність проблеми ГЗ у клінічній практиці лікарів різних спеціальностей зумовлена тим, які при дефіциті тиреоїдних гормонів (ТГ), що необхідні для нормального функціонування майже кожної клітини, розвиваються



складні порушення в усіх органах і системах. Оскільки провідною функцією ТГ є підтримування основного обміну, при їх дефіциті відбувається зниження споживання кисню тканинами, а також зниження витрат енергії та утилізації енергетичних субстратів. Замісна терапія, котру використовують під час лікування гіпотиреозу, повною мірою не забезпечує необхідний баланс гормонів ЩЗ і повноцінного життя. Очевидно, щоб досягти оптимальної якості життя пацієнтів із ГЗ недостатньо лише гормональної корекції. А отже виникає необхідність спрямованого вивчення механізмів патогенезу цього захворювання, що супроводжується порушенням усіх видів обміну речовин. Варто особливо звернути увагу, що ГЗ супроводжується порушеннями гормонального гомеостазу, зменшенням рухової активності, збільшенням маси тіла і, як наслідок, змінами якості життя. Відповідно, вивчення взаємозв'язку між впливом помірного фізичного навантаження (ПФН) і порушенням функції ЩЗ є важливим для визначення ролі системних чинників регулювання загального метаболізму й обґрунтування патогенетичних патернів розвитку специфічного симптомокомплексу при ГЗ [3].

#### Мета роботи

Встановити вплив помірного фізичного навантаження на прояви ендотоксемії при експериментальному гіпотиреозі.

#### Матеріали і методи дослідження

У дослідженні використали 74 самки білих щурів лінії Вістар масою 200–230 г, яких утримували на базі віварію кафедри патологічної фізіології ДВНЗ «ІФНМУ». Тварин поділили на 5 груп: I – інтактна; II – контрольна; III – з експериментальним гіпотиреозом, який моделювали шляхом щоденного додавання до питної води тварин препарату Mercazolil, діюча речовина – Thiamazole (ТОВ Фармацевтична компанія «Здоров'я», м. Харків, Україна) протягом 30 днів; IV – ПФН протягом одного місяця на тредбані зі швидкістю 10 м/хв протягом 15 хв щодня; V – з експериментальним ГЗ і ПФН.

Ефективність відтворення гіпотиреозу для використаної моделі підтверджували результатами дослідження гормонального статусу. У сироватці крові щурів досліджували вміст ТТГ (TSH ELISA, Germany), вільного трийодтироніну (Т3) (Т3 EIA KIT, USA), вільного тироксину (Т4) (Т4 EIA KIT, USA).

Визначали вміст молекул середньої маси (МСМ) у сироватці крові та гомогенатах легень і печінки за методикою Н.І. Габріелян і співавт., а також рівень лактату (ЛТ) крові. Тварин зважували для оцінювання змін маси тіла (МТ).

Результати опрацювали із застосуванням непараметричних статистичних критеріїв Вілкоксона та Sign-тесту за допомогою програми «Statistica 7» («StatSoft, Inc.», США). Відмінності вважали вірогідними, якщо величина Р становила 95% і більше ( $p < 0,05$ ).

#### Результати та їх обговорення

Після першого тижня експерименту в щурів з експериментальним гіпотиреозом спостерігали зниження фізичної активності, зацікавлення довкіллям, зберігався

задовільний апетит. Після 4 тижнів дослідження щури III групи були млявими, малоактивними, у них погіршувался інтерес до факторів оточення, з'являлися ознаки облисіння шерстяного покриву, шерсть місцями набувала жовтуватого кольору. У частини самок відзначили підвищену сухість шкіри: з'являлось лущення, ерозії та виразки.

Виявили, що у тварин III групи з експериментальним ГЗ рівень Т3 та Т4 знижувались у 3,9 та 3,3 раза ( $p < 0,05$ ) відповідно у порівнянні з даними інтактних тварин. Вміст ТТГ у сироватці крові цієї групи вірогідно підвищувався більше ніж удвічі, що може вказувати на реакцію гіпоталамо-гіпофізарної системи на суттєве зниження вмісту ТГ [1].

У щурів IV групи рівень тиреоїдних гормонів мав протилежну динаміку. Так, у тварин, котрі зазнали дії помірного фізичного навантаження, не виявили вірогідної різниці вмісту ТГ щодо контролю, а за умов поєднання експериментального ГЗ і ПФН рівні Т3 і Т4 у порівнянні з III групою були на 72% та 54% ( $p < 0,05$ ) нижчими.

Відзначили збільшення МТ у III групі більше ніж на 25% ( $p < 0,05$ ), що є типовим для ГЗ, а в IV–V групах вірогідного приросту МТ не спостерігали.

Часто патологічні стани супроводжуються розвитком ендогенної інтоксикації (ЕІ), яку можна охарактеризувати як поліетіологічний і поліпатогенетичний синдром, зумовлений накопиченням у тканинах і біологічних рідинах ендогенних токсичних субстратів – надлишку продуктів нормального або порушеного метаболізму. Так, при експериментальному гіпотиреозі рівень МСМ у крові збільшився на 19,44% ( $p < 0,05$ ), в основних органах детоксикації, печінці й легенях, – на 16,63% та 39,71% відповідно (рис. 1).

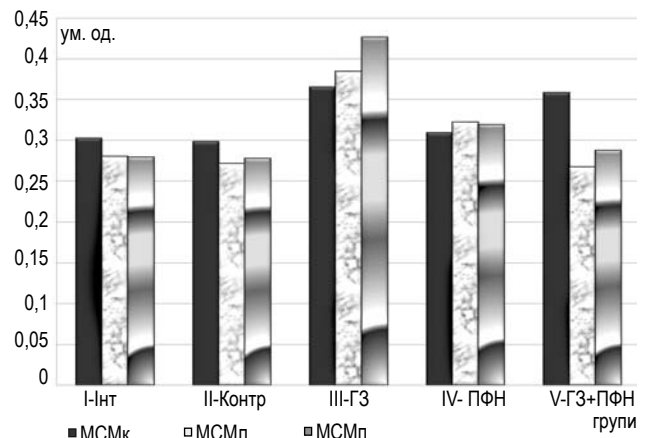


Рис. 1. Динаміка рівня середньомолекулярних пептидів у крові (МСМк), гомогенатах легень (МСМл) і печінки (МСМп).

Основними компонентами фракції МСМ є середньомолекулярні пептиди. Розпад білкових молекул, унаслідок якого вони утворюються, відбувається під впливом дії протеїназ. Виявили превалювання МСМ при довжині хвилі 280 нм, що свідчить про протеоліз білків, збігаючись із даними фахової літератури [4]. Оскільки рівень МСМ залежить, з одного боку, від інтенсивності розпаду

біополімерів, а з іншого, – від швидкості їх виведення через органи дезінтоксикації, можемо припустити порушення обох складових цього процесу [5].

Отже, наші результати підтверджують залежність ступеня ЕІ від тривалості патологічного процесу і відповідають типовій динаміці щодо інших патологічних станів [6]. Проте рівень МСМ був меншим у ІV і V дослідних групах із деякими коливаннями у тварин із ГЗ і ПФН. Рівень МСМ у гомогенаті печінки тварин із ГЗ і ПФН перевищував контрольні дані на 21,14% ( $p < 0,05$ ), що може свідчити про утримання продукції ендотоксинів на значно нижчому рівні завдяки антиоксидантним механізмам, які активуються при фізичному навантаженні. Це вказує на доцільність застосування ПФН із лікувальною та профілактичною метою та є вагомим захисним чинником щодо ушкодження однієї з найважливіших дезінтоксикаційних систем організму – печінкової [4,7].

Відомо, що при різних метаболічних порушеннях і критичних станах знижується клітинна перфузія шляхом розладів мікроциркуляції, зокрема у респіраторній системі, чутливим маркером якої є лактат плазми [8]. Вміст ЛТ у крові максимально збільшувався у III групі, перевищував контрольні показники у 5,4 раза та був значно нижчим у тварин із ПФН і ГЗ (рис. 2).

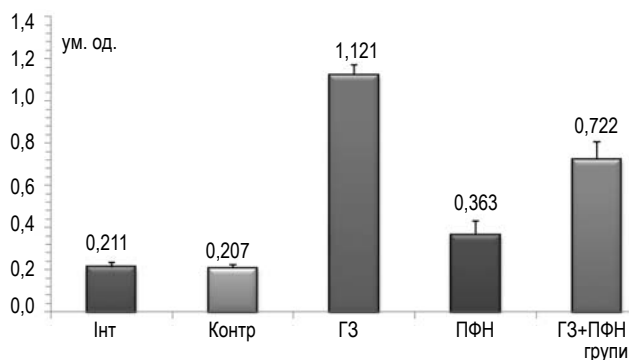


Рис. 2. Динаміка лактату при гіпотиреозі (ГЗ), помірному фізичному навантаженні (ПФН) та їхні поєднанні.

Це підтверджує порушення клітинної перфузії і, як наслідок, вказує на гіпоксичний стан у результаті неадекватного постачання тканин киснем. Необхідно зауважити, що, за даними деяких авторів, ЛТ продукується багатьма органами: шкірою, м'язами, легеньми (хоча і значно меншою мірою), у продукції ЛТ також беруть участь еритроцити та лейкоцити. Однак в умовах гіпоксії, різних критичних станів і гіпотиреозу через

стимуляцію ендотоксином, унаслідок інгібування пірватдегідрогенази, продукція лактату значно збільшується [5,6]. Наші результати збігаються з даними інших авторів щодо коливань ЛТ відповідно до потенціювання гострого легеневого ушкодження внаслідок дисфункції респіраторного бар'єра, що супроводжується розвитком лактатацидозу в умовах значних розладів системного кровообігу. Крім того, лактатацидемію можна вважати індикатором системної гіперперфузії [9].

За умов ПФН зросла рухова активність щурів ІV і V груп, а також посилюється їхній інтерес до їжі та взаємодії з іншими тваринами. Варто відзначити, що зі збільшенням тривалості експерименту руховий потенціал під час ПФН у V групі щурів знизився більше ніж на 50% через 3 тижні від початку експерименту. При ПФН і ГЗ не виявили ерозії та виразки на шкірі, але через 2 тижні від початку експерименту визначили часткову алопецію, у деяких тварин – зміну кольору шерсті з незначним лущенням шкіри у порівнянні зі щурами III групи. Це може вказувати на прогресування симптомів гіпотиреозу в результаті порушення детоксикуючих функцій фізіологічних бар'єрів у легень і печінці, хоч і значно повільніше, ніж у тварин із ГЗ без ПФН [7].

Оцінюючи результати дослідження, можна зробити висновок, що при гіпотиреозі виникає стан ЕІ, котрий зумовлений інтенсифікацією процесів утворення середньомолекулярних пептидів і лактату. Наслідком цього є надлишкове накопичення МСМ і ЛТ в організмі через неможливість їх швидкого елімінування та виведення. Формування передумов для обмеження ефекту ендотоксинів відбувається в результаті підвищення фізичної активності, це підтверджують відомості щодо зменшення проявів ендотоксичних ефектів під впливом тривалого помірного фізичного навантаження.

### Висновки

При гіпотиреозі розвиваються функціональні порушення детоксикаційної роботи печінки та легень. Виявили вірогідне збільшення МТ при ГЗ без фізичного навантаження. Довели позитивний вплив ПФН, який проявився у зменшенні ознак основного симптомокомплексу ГЗ. Відзначили підвищення рухової активності, збільшення зацікавленості до факторів довкілля, зменшення МТ і загальної інтоксикації, мінімальні прояви гіпотиреозу.

**Перспективи подальших досліджень** полягають у вивченні тривалих помірних фізичних навантажень і медикаментозної терапії гіпотиреозу на структуру взаємозв'язків між лабораторними та морфологічними параметрами респіраторної й гепатобілярної систем.

### Список літератури

1. Воронич-Семченко Н.М. Біохімічні показники сироватки крові щурів з гіпотиреозом в умовах корекції препаратом йодид-100 / Н.М. Воронич-Семченко // Фізіологічний журнал. – 2007. – Т. 53. – №6. – С. 9–13.
2. Катеренчук В.І. Серцево-судинна патологія, зумовлена гіпотиреозом / В.І. Катеренчук, І.П. Катеренчук // Ендокринологія. – 2012. – Т. 17. – №1. – С. 106–112.
3. Oxidative stress in experimental hypothyroidism: effect

of vitamin E supplementation / M.S. Petrulea, I. Duncea, G. Hazil at al. // Clujul Medical. – 2010. – Vol. LXXXIII. – №2. – P. 245–249.

4. Попадинець О.Г. Взаємозв'язок структурних змін у стінці сечового міхура під впливом різноманітних факторів із біохімічними процесами / О.Г. Попадинець, А.М. Ерстенюк // Архів клінічної медицини. – 2012. – №1(18). – С. 72–77.
5. Герасимчук М.Р. Нові погляди на оцінку гострого легеневого ушкодження на фоні експериментального перитоніту

- / М.Р. Герасимчук, Л.М. Заяць // Таврический медико-биологический вестник. – 2012. – Т. 15. – №3. – Ч. 1(59). – С. 63–68.
- The role of endogenous intoxication in the lung injury development during experimental diabetes mellitus / M.R. Gerasymchuk, B.M. Kishchuk, L.M. Zayats, V.V. Cherkasova // Клінічна фармація. – 2013. – Т. 17. – №4. – С. 48–51.
  - Побігун Н.Г. Дослідження змін показників кальцієвого метаболізму в шурів зі зниженою функцією щитоподібної залози під впливом фізичного навантаження / Н.Г. Побігун // Буковинський медичний вісник. – 2014. – Т. 18. – №3(71). – С. 119–123.
  - Microcirculation impairment and blood pressure in sepsis / S. Kvolik, I. Drenjančević-Perić, I. Takač at al. // Medicinski Glasnik. – 2009. – Vol. 6. – №1. – P. 32–41.
  - Chechet O. Effect on the peroxide oxidation of proteins of new derivates of the 3-hydroxypyridine / O. Chechet, A.L. Badger, V.B. Kuzin // STM. – 2010. – P. 22–25.
  - hypothyroidism: effect of vitamin E supplementation. *Chujul Medical*, LXXXIII (2), 245–249.
  - Popadynets, O. H., & Ersteniuk, A. M. (2012) Vzaimozviazok strukturnykh zmin u stinsti sechovoho mikhura pid vplyvom riznomanitnykh faktoriv iz biokhimichnymy protsesamy [Relationship structural changes in the bladder wall under the influence of various factors of biochemical processes]. *Arkhiv klinichnoi medytsyny*, 18, 72–77. [in Ukrainian].
  - Gerasymchuk, M. R., & Zaiats, L. M. (2012) Novi pogliady na otsinku hostroho lehenevoho ushkodzhennia na foni eksperymentalnoho perytonitu [New views on the assessment of acute lung injury in experimental peritonitis]. *Tavrisheskij mediko-biologicheskij vestnik*, 15(3)/1(59), 63–68. [in Ukrainian].
  - Gerasymchuk, M. R., Kishchuk, B. M., Zayats, L. M., & Cherkasova, V. V. (2013) Role of endogenous intoxication in the lung injury development during experimental diabetes mellitus. *Klinichna farmatsiia*, 17(4), 48–51. [in Ukrainian].
  - Pobihun, N. H. (2014) Doslidzhennia zmin pokaznykiv kaltsiievoho metabolizmu v shchuriv zi znyzhenoiu funktsiieiu shchypodibnoi zalozy pid vplyvom fizychnoho navantazhennia [The investigation of changes of indexes of calcium metabolism in rats with decreased function of thyroid gland under the influence of physical loading]. *Bukovynskiy medychnyi visnyk*, 18, 3(71) 119–123. [in Ukrainian].
  - Kvolik, S., Drenjančević-Perić, I., & Takač, I. (2009) Microcirculation impairment and blood pressure in sepsis. *Medicinski Glasnik*, 6(1), 32–41.
  - Chechet, O., Badger, A. L., & Kuzin, V. B. (2010) Effect on the peroxide oxidation of proteins of new derivates of the 3-hydroxypyridine. *STM*, 22–25.

### References

- Voronych-Semchenko, N. M. (2007) Biokhimichni pokaznyky syrovatky krovi shchuriv z hipotyreozyom v umovakh korektsii preparatom yodyd-100 [Biochemical parameters of blood serum of rats with hypothyroidism in terms of correcting by Iodide-100 drug]. *Fiziologichnyy zhurnal*, 53(6), 9–13. [in Ukrainian].
- Katerenchuk, B. I. & Katerenchuk, I. P. (2012) Sertsevo-sudynna patolohiia, zmovlena hipotyreozyom [Cardiovascular disease agreed hypothyroidism]. *Endokrynolohiia*, 17(1), 106–112. [in Ukrainian].
- Petrulea, M. S., Duncea, I., Hazil, G., Dragotioiu, G., Decea, N., & Mureşan, A. (2010) Oxidative stress in experimental

### Відомості про автора:

Герасимчук М.Р., к. мед. н., доцент каф. патологічної фізіології, ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет»,  
E-mail: marta\_solomea@yahoo.com.

### Сведения об авторе:

Герасимчук М.Р., к. мед. н., доцент каф. патологической физиологии, ГВУЗ «Івано-Франковский национальный медицинский университет»,  
E-mail: marta\_solomea@yahoo.com.

### Information about author:

Gerasymchuk M.R., MD, PhD, Associate Professor of Pathophysiology department, E-mail: marta\_solomea@yahoo.com.

Надійшла в редакцію 20.03.2015 р.

Н. А. Рикало, Л. О. Яровенко

## Особливості репаративної регенерації тканини печінки у щурів при експериментальному тетрахлорметановому та алкогольному гепатиті

Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова

**Ключові слова:** хронічний гепатит, цироз печінки, щури,  $CCl_4$ , етанол.

Хронічні гепатити належать до найпоширеніших патологій печінки, які часто завершуються цирозом. Мета роботи полягала в дослідженні вікових особливостей механізмів репаративної регенерації тканини печінки, патогенезу та патоморфозу при хронічних токсичних гепатитах у 90 статевонезрілих щурів. Вивчили фази клітинного циклу та морфологічні зміни печінки з використанням цитофлуориметричного та методу світлової мікроскопії. Встановили, що при хронічному токсичному гепатиті відбувається збільшення плоідності ядерної ДНК  $> 8c$ , відсотка ядер у S-фазі, фрагментації ядерної ДНК; гістологічно – гідропічна дистрофія, лімфостаз, фіброз. При хронічному алкогольному гепатиті визначили зменшення синтетичних процесів у ядрах гепатоцитів, а поліплоїдизації ядерної ДНК не спостерігали. Це свідчить про антипроліферативний ефект етанолу. Морфологічно встановили жирову дистрофію печінки у поєднанні з гідропічною.

### Особенности репаративной регенерации ткани печени у крыс при экспериментальном тетрахлорметановом и алкогольном гепатите

Н. А. Рыкало, Л. А. Яровенко

Хронические гепатиты относятся к распространенным патологиям печени, которые часто завершаются циррозом. Цель работы – исследовать возрастные особенности механизмов репаративной регенерации ткани печени, патогенез и патоморфоз при хронических токсических гепатитах у 90 неполовозрелых крыс. Исследовали фазы клеточного цикла и морфологических изменений печени, используя цитофлуориметрический и метод световой микроскопии. Установлено, что при хроническом токсическом гепатите происходит увеличение плоидности ядерной ДНК  $> 8c$ , процента ядер в S-фазе, фрагментации ядерной ДНК; гистологически – гидропическая дистрофия, лимфостаз, фиброз. При хроническом алкогольном гепатите происходило уменьшение синтетических процессов в ядрах гепатоцитов, полиплоидизации ядерной ДНК не наблюдали. Это свидетельствует об антипролиферативном эффекте этанола. Морфологически установлена жировая дистрофия печени в сочетании с гидропической.

**Ключевые слова:** хронический гепатит, цирроз, крысы,  $CCl_4$ , этанол.**Патология.** – 2015. – №1 (33). – С. 84–89

### Features of reparative regeneration of the liver tissue in rats during experimental tetrachloromethanic and alcoholic hepatitis

N. A. Rykalo, L. A. Yarovenko

Chronic hepatitises are common pathology of the liver, which often end with the formation of cirrhosis (LC).

Aim. The features of reparative regeneration of liver tissue, as well as pathomorphosis of chronic toxic hepatitis of different etiology, namely tetrachloromethanic (CTH) and alcoholic (CAH), were studied in the experiment in immature rats.

Methods and results. The results of flow cytometric and morphological studies have shown that in rats with CTH significant impairment of lymph flow develops in the form of edema in liver tissue; the number of functioning lymphatic vessels with the presence of lymphangiectasias increases that can significantly influence the processes of fibrogenesis. In rats with CAH fatty liver combined with hydropic one is observed. It was established that a characteristic feature of hepatocytes population of immature rats in CTH is increase of nuclear DNA ploidy  $> 8c$ , reducing of the percentage of nuclei in the range  $G_0G_1$  with increasing percentage of cell nuclei in the S-phase, nuclear DNA fragmentation and proliferation index. In CAH, unlike CTH, there was a decrease of synthetic processes in the nuclei of hepatocytes, and polyploidy of nuclear DNA was not observed.

Conclusion. This demonstrates the antiproliferative effect of ethanol.

**Key words:** Chronic Hepatitis, Liver Cirrhosis, Rats, Carbon Tetrachloride Poisoning, Ethanol.**Pathologia.** 2015; №1 (33): 84–89

Хронічні захворювання печінки є однією з актуальних проблем сучасної гепатології через значну поширеність і тенденцію до збільшення захворюваності серед населення різних країн світу, зокрема й України. Актуальність вивчення хронічних токсичних гепатитів зумовлена не тільки високою частотою формування цирозу печінки (ЦП) та значною часткою розвитку позапечінкових ускладнень [1], але й недостатньою ефективністю фармакотерапії.

Класичною моделлю для відтворення типових патологічних процесів у печінці вважають токсичний гепатит, що спричинений  $CCl_4$ . Введенням  $CCl_4$  та етанолу можна

порівняно легко й швидко викликати білкову та жирову дистрофію печінки, розлади кровообігу, порушення екскреції жовчі, а фіброзування органа (особливо за типом цирозу) відбувається лише в певних умовах досліду та тривалого експерименту. У більшості випадків експериментальний цироз печінки моделюють на білих статевозрілих щурах шляхом ізольованого введення  $CCl_4$  протягом тривалого часу (від 2 до 13 місяців) чи у поєднанні з етанолом [2]. Серед морфологічних знахідок слід відзначити формування портального ЦП при комбінованому введенні етанолу та  $CCl_4$  унаслідок збільшення вмісту ацетальдегіду і лактату, які можуть

стимулювати синтез колагену фібробластами. Це призводить до накопичення сполучної тканини в печінці та розвитку цирозу; ізольоване введення  $CCl_4$  частіше спричиняє постнекротичний ЦП [3]. Морфологічні зміни при хронічних ураженнях печінки у статевонезрілих тварин вивчені недостатньо.

У світі на алкогольну залежність страждають 140 млн осіб, в Україні – майже 1 млн. В останнє десятиліття алкоголізм набуває все більшого поширення серед молоді країни, передусім підлітків і дітей. Серед хворих, які тривалий час зловживають алкоголем, у 90–100% розвивається стеатогепатит, у 10–35% – хронічний алкогольний гепатит (ХАГ), у 8% – алкогольний цироз (АЦ). Клінічні прояви можуть варіювати від відсутності будь-яких симптомів до класичної картини важкої форми пошкодження печінки з симптомами печінкової недостатності та портальної гіпертензії [4].

Отже, актуальним є вивчення механізмів регенерації на рівні тканини, а також морфологічних особливостей тканин печінки при хронічних токсичних uszkodженнях печінки різної етіології. Відтак становить інтерес дослідження морфологічних особливостей і механізмів репаративної регенерації, процесів проліферації тканин печінки при хронічних тетрахлорметановому й алкогольному гепатитах у статевонезрілих тварин.

#### Мета роботи

Дослідити вікові особливості механізмів репаративної регенерації тканини печінки, патогенезу та патоморфозу при експериментальних хронічних токсичних гепатитах.

#### Матеріали і методи дослідження

Експериментальні дослідження виконали в 3 серіях експерименту на 90 білих лабораторних статевонезрілих щурах віком 1,5 місяця, початкова маса тіла – 60–70 г. Утримували тварин у віварії ВНМУ ім. М.І. Пирогова відповідно до загальноприйнятих правил і стандартів. Експерименти на тваринах виконали з дотриманням вимог Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006 р.), ст. 230, а також згідно з «Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, які використовуються з експериментальними та іншими науковими цілями» (Страсбург, 1985), «Загальними етичними принципами експериментів на тваринах», що схвалені I Національним конгресом із біоетики (20.09.2004 р., Київ).

У 1 серії дослідів тваринам ( $n=20$ ) протягом 6 тижнів двічі на тиждень інтрагастрально вводили 20% олійний розчин  $CCl_4$  у дозі 0,1 мл/100 г маси в комбінації з 5% розчином етанолу як пиття (експериментальна модель хронічного тетрахлорметанового гепатиту (ХТГ)) [5]. Контрольна група – 10 інтактних щурів.

У 2 серії експерименту використали 30 щурів: 10 (інтактні) – контрольна група; 20 тваринам протягом 8 тижнів для моделювання ХТГ та ЦП двічі на тиждень вводили  $CCl_4$  та етанол із наступним «відпочинком» протягом 6 тижнів після припинення введення гепатотоксинів [6].

У 3 серії у 20 тварин моделювали хронічний алкогольний гепатит за методикою Г.А. Ковальова (2004) [7]. Тваринам протягом 12 тижнів щоденно інтрагастрально

вводили 96% розчин етанолу з розрахунку 14–18 г/кг маси тіла на добу. До інтактної групи ввійшли тварини тієї самої статі та віку, яких утримували в аналогічних умовах ( $n=10$ ).

Для діагностики функціонального стану печінки використовували біохімічні методи (визначення загального білка, альбумінів, загального білірубіну та його фракцій,  $\beta$ -ліпопротеїнів, активність аланінамінотрансферази, аспаратамінотрансферази,  $\gamma$ -глутамілтранспептидази, лужної фосфатази, тимолову пробу).

За допомогою цитофлуориметричного методу визначали фази клітинного циклу, фрагментацію та плоїдність ядерної ДНК гепатоцитів щурів. Після виведення тварин з експерименту під наркозом здійснювали забір тканини печінки для цитофлуориметрії та гістологічних досліджень. Печінку щурів негайно вилучали. Суспензії ядер із клітин печінки одержували за допомогою набору «CyStainDNA» фірми «Partec» (ФРН) відповідно до протоколу-інструкції виробника. Цитофлуориметричний аналіз здійснили на багатофункціональному науководослідному проточному цитометрі «PartecPAS» фірми Partec (ФРН) у НДЦ ВНМУ ім. М.І. Пирогова. Фрагментацію ДНК виконали програмними засобами FloMax (фірма Partec, ФРН) методом виділення  $Sub-G_1$  ділянки на ДНК-гістограмах, що представлена на гістограмі інтервалом  $RN_1$  [6].

Для гістологічного аналізу шматочки тканини печінки фіксували в 10% розчині нейтрального формаліну і проводили через батарею спиртів із наступним закладенням у парафін за загальноприйнятою методикою. Парафінові зрізи тканини печінки фарбували гематоксилін-еозином за ван Гізоном для виявлення колагенових волокон, а також використовували посріблення за Гоморі. Гістологічні зрізи вивчали під світлооптичним мікроскопом «OLIMPUS BN-2» зі збільшенням від 100 до 400 разів. Активність запального процесу та ступінь фіброзу оцінювали за METAVIR.

Статистичний аналіз цифрових даних здійснили за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Excel XP, використовуючи параметричні (t-критерій Стьюдента) та непараметричні (u-критерій Манна – Уїтні) методи оцінювання. Вірогідною вважали ймовірність похибки менше ніж 5% ( $p<0,05$ ).

#### Результати та їх обговорення

Аналіз морфологічних досліджень показав, що в усіх експериментальних тварин є ознаки хронічного токсичного гепатиту. Встановили надзвичайно глибокі зміни альтеративного, ексудативного та проліферативного характеру, але у кожній окремо взятої експериментальної тварини співвідношення цих ознак було не ідентичним.

На підставі морфологічних досліджень вперше встановили, що при експериментальному ХТГ у статевонезрілих щурів після 6-тижневого введення  $CCl_4$  розвивається значне порушення лімфообігу: набряк, збільшення кількості лімфатичних судин, які функціонують, із наявністю лімфангіектазій. Це може суттєво впливати на фіброгенез у печінці, а тому потребує лікувальної корекції (рис. 1).

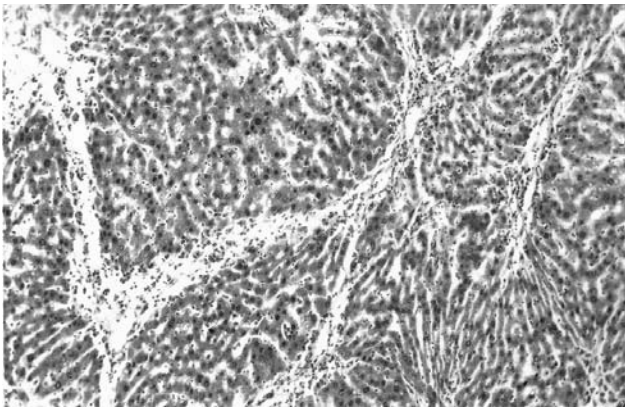


Рис. 1. Мікрофотографія гістологічного зрізу печінки щура з ХТГ 1 серії експериментів. Значний набряк портальних шляхів із розвитком лімфангіектазій і цирозу печінки. Світлова мікроскопія, забарвлення гематоксилін-еозином, зб.  $\times 100$ .

Характерними є ознаки цитолізу, васкулітів, дистрофічно-некротичні зміни та виразна запальна інфільтрація, зокрема фрагментація та лізис аргірофільних волокон (рис. 2). Спостерігали адгезію високоактивних макрофагів і лімфоцитів до дистрофічно змінених гепатоцитів (імунний клінінг) на тлі зернистої дистрофії гепатоцитів і розвитку «порожніх» сполучнотканинних септ (рис. 3).

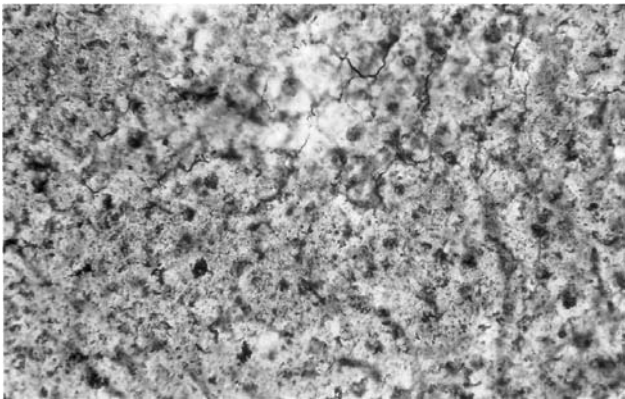


Рис. 2. Мікрофотографія гістологічного зрізу печінки щура з ХТГ 1 серії експериментів. Фрагментація та лізис аргірофільних волокон. Світлова мікроскопія, посріблення за Гоморі, зб.  $\times 400$ .

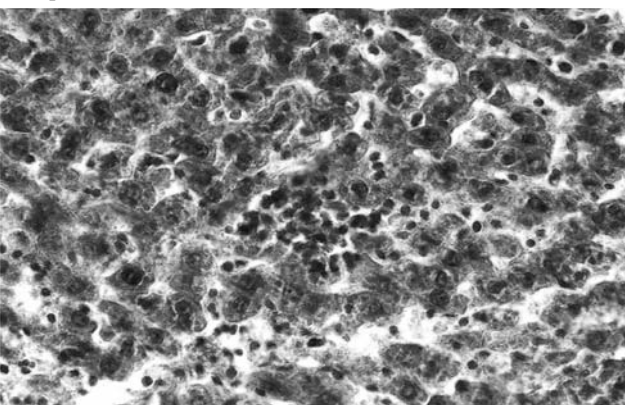


Рис. 3. Мікрофотографія гістологічного зрізу печінки щура з ХТГ 1 серії експериментів. Адгезія високоактивних макрофагів і лімфоцитів до дистрофічно змінених гепатоцитів (імунний клінінг) на тлі зернистої дистрофії гепатоцитів і розвитку «порожніх» сполучнотканинних септ. Світлова мікроскопія, забарвлення гематоксилін-еозином, зб.  $\times 400$ .

Після 8-тижневого введення гепатотоксинів і 6-тижневого «відпочинку» в печінці піддослідних щурів відбувалися певні компенсаторні процеси, які полягали у зменшенні некротичних і дистрофічних змін у гепатоцитах, осередково – в зменшенні інтенсивності набряку. Однак іноді ексудативні та проліферативні компоненти запалення посилювались як у портальних шляхах, так і всередині часточок. Ці предиктори фіброзу посилювались і були морфологічним субстратом для розвитку численних щільних сполучнотканинних порто-портальних, порто-центральных септ з облітерацією центральных вен і формуванням різних розмірів псевдочасточок. Тобто у тварин групи порівняння цієї серії експериментів у печінці виявили не лише розвиток ЦП (F<sub>3</sub>-F<sub>4</sub> за системою METAVIR), але й спостерігали прогресивність його перебігу. Так, в окремих тварин зберігався набряк портальних шляхів і перипортальні некрози (рис. 4).

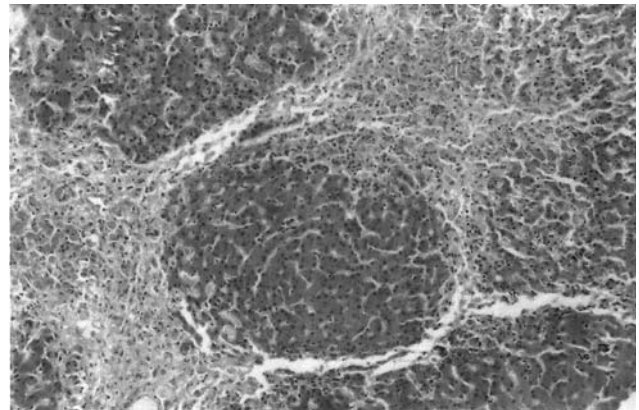


Рис. 4. Мікрофотографія гістологічного зрізу печінки щура з ХТГ 2 серії експериментів. Значний набряк і масивний коліквацийний некроз гепатоцитів на тлі цирозу печінки. Світлова мікроскопія, забарвлення гематоксилін-еозином, зб.  $\times 100$ .

Відбувалось відокремлення деяких гепатоцитів від печінкових балок набряковою рідиною, котрі при звичайній світловій мікроскопії не мали виразних ознак дистрофії та некрозу (рис. 5).

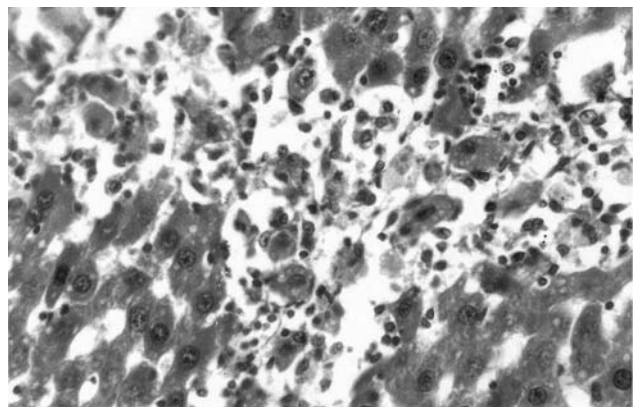


Рис. 5. Мікрофотографія гістологічного зрізу печінки щура з ХТГ 2 серії експериментів. Дезінтегровані, можливо, мігруючі, гепатоцити на тлі набряку та запальної інфільтрації. Світлова мікроскопія, забарвлення гематоксилін-еозином, зб.  $\times 400$ .

Це явище оцінювали як можливу міграцію гепатоцитів до «потрібного» місця регенерації органа. Спонтанна, неіндукована гепатопротекторами регенерація гепатоцитів у більшості статевонезрілих щурів була, на наш погляд, інтенсивною. Вона проявлялась гіперплазією, гіпертрофією гепатоцитів із наявністю великої кількості поліплоїдних ядер і збільшенням кількості двоядерних клітин, що, можливо, свідчить про їх ацитокінетичний поділ. Не повністю відновлювались структури стромы, зокрема синусоїди, тому часточки органа нагадували «вузли-регенерати».

Отже, через 14 тижнів від початку експерименту після 6-тижневого «відпочинку» в печінці піддослідних щурів характерними ознаками ЦП, що сформувався на тлі ХТГ, була наявність сполучнотканинних септ з облітерацією центральних вен і формуванням псевдо-часточок (рис. 4). Спонтанна регенерація в цьому випадку здебільшого відбувалася шляхом поліплоїдизації та гіпертрофії гепатоцитів.

Під час дослідження печінки щурів із ХАГ встановили розвиток жирової дистрофії у поєднанні з гідропічною. Жирова дистрофія завжди мала осередковий характер, була переважно дрібновакуольною, рідко – крупновакуольною. На відміну від гідропічної при ХТГ, жирова дистрофія при ХАГ не впливала на архітекtonіку часточок і балкову орієнтацію гепатоцитів, якщо не враховувати певне розширення просвіту синусоїдів набряковою рідиною та пожвавлення проліферації клітин

Купфера, що її супроводжували. На нашу думку, жирова дистрофія при ХАГ має менше значення у прогресуванні патології в порівнянні з гідропічною при ХТГ. Жирова та гідропічна дистрофії гепатоцитів призводили до набряку гепатоцитів, великих вогнищ некрозу й атрофії клітин печінки із запальною інфільтрацією переважно мононуклеарами (рис. 6).

Під час дослідження клітинного циклу та фрагментації ядерної ДНК клітин печінки встановили, що в щурів із ХТГ вірогідно зменшується відсоток ядер клітин печінки, які перебувають у G<sub>0</sub>G<sub>1</sub>-фазі, – на 7,1% (p<0,05) та 3,1% (p<0,01) при ХАГ у порівнянні з контролем (табл. 1). Доведено, що в щурів із ХТГ і ХАГ вірогідно зменшується відсоток ядер гепатоцитів, які перебувають у G<sub>2</sub>M-фазі, – на 19,1% (p<0,05) і 26,7% (p<0,01) у порівнянні з інтактом.

Порівнюючи показники клітинного циклу, які визначили цитофлуориметрично, встановили: у тварин із ХТГ відбувається посилення процесів синтезу ДНК в ядрі. На це вказує збільшення відсотка ядер клітин печінки, котрі перебувають у S-фазі на 58,3% (p<0,05), а при ХТГ цей показник навпаки зменшується на 56,2% (p<0,01) у порівнянні з аналогічними показниками інтактних тварин, що вказує на антипроліферативний ефект етанолу. Збільшення індексу проліферації (ІР визначається як сума G<sub>2</sub>M + S, %) при ХТГ відбувається на 23,0% (p<0,01), при ХАГ – на 19,3% (p<0,01), порівнюючи з контролем (табл. 1).

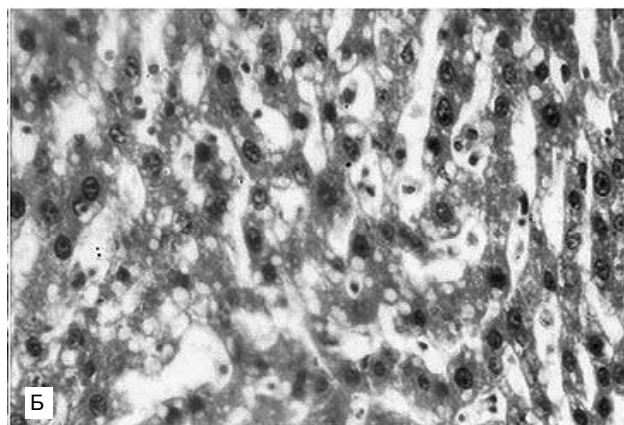
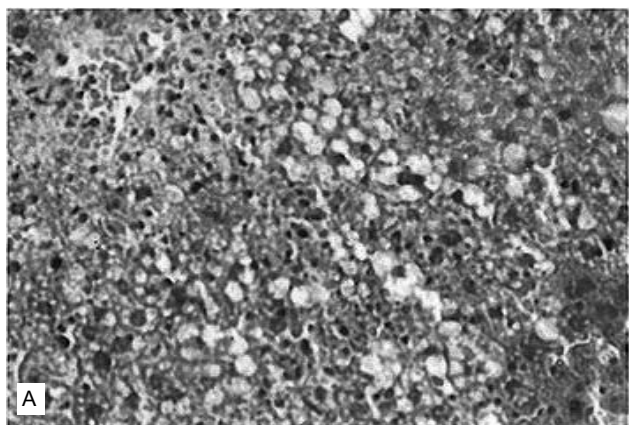


Рис. 6. Мікрофотографія гістологічного зрізу печінки у щурів із ХАГ 3 серії експериментів. А – жирова та гідропічна дистрофія з розвитком некрозу гепатоцитів при ХАГ. Б – значний набряк стромы. Жирова дистрофія й атрофія гепатоцитів при ХАГ. Світлова мікроскопія, забарвлення гематоксилін-еозин, зб.  $\times 400$ .

Таблиця 1

**Фази клітинного циклу, фрагментація ядерної ДНК гепатоцитів, поліплоїдність набору ДНК в ядрах клітин печінки статевонезрілих щурів при експериментальних хронічних токсичних гепатитах**

Група	Підгрупа	G <sub>0</sub> G <sub>1</sub> (%)	S (%)	G <sub>2</sub> M (%)	ІР (%)	Sub-G <sub>1</sub> (%)	> 8с, %
ХТГ	Контроль, n=10	76,48±2,53	2,30±0,73	21,22±3,09	23,52±2,53	2,57±0,55	2,26±1,16
	Патологія, n=20	71,08±3,65*	3,64±1,54*	25,27±4,04*	28,92±3,65*	5,32±1,66*	4,91±1,58*
ХАГ	Контроль, n=10	85,46±0,35	1,30±0,13	13,24±0,38	14,54±0,35	1,84±0,04	1,15±0,07
	Патологія, n=20	82,79±0,42*#	0,57±0,08*#	16,77±0,53*#	17,34±0,49*#	2,24±0,09*#	1,25±0,19 #

Примітки: \* – вірогідність відмінностей (p<0,05) у порівнянні з контрольною групою; # – вірогідність відмінностей (p<0,05) у порівнянні показників ХТГ і ХАГ.

За даними Мушкамбарова Н.Н. (2007), свідченням розвитку незворотного ушкодження клітин, тобто патогенно індукованого апоптозу, є збільшення рівня фрагментації ядерної ДНК [8]. Довели, що при хронічних токсичних гепатитах різної етіології відбувається збільшення фрагментації ядерної ДНК гепатоцитів щурів: у 2,1 раза ( $p < 0,001$ ) при ХТГ і на 21,7 % ( $p < 0,01$ ) при ХАГ. Це свідчить, що  $CCl_4$  суттєвіше посилює процеси некроапоптозу в печінці, порівнюючи з етанолом (табл. 1).

При ХТГ і ХАГ відбувається значна загибель диплоїдних гепатоцитів, що перебувають у фазі  $G_0G_1$ . Крім того, можна відзначити, що показники плоідності набору ДНК в ядрах клітин печінки статевонезрілих щурів при експериментальних гепатитах відрізняються залежно від етіології. Так, при ХТГ особливістю популяційного складу гепатоцитів є збільшення відсотка поліплоїдних ядер у 2,2 раза ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з інтактом, а при ХАГ різняться від інтактних значень лише на 8,7% ( $p > 0,05$ ) (табл. 1).

Наші результати збігаються з даними інших авторів [9,10], які констатують аналогічні зміни у статевозрілих тварин при дії  $CCl_4$ . Поліплоїдію вважають механізмом еволюційного пристосування, що показує високий ступінь незворотної печінковоклітинної диференціації, який знижує ризик геномних ушкоджень органа [11]. Збільшення кількості поліплоїдних гепатоцитів при етаноліндукованому гепатиті пояснюється антирегенераторним ефектом етанолу на гепатоцити [12].

Отже, характерною ознакою популяції гепатоцитів статевонезрілих щурів при ХТГ є збільшення плоідності ядерної ДНК  $>8c$  (у 2,2 раза,  $p < 0,01$ ). Проте за умов ХАГ (на відміну від ХТГ) поліплоїдизацію клітин печінки не спостерігали.

## Висновки

1. У печінці статевонезрілих щурів після 6-тижневого введення  $CCl_4$  розвивається значне порушення лімфообігу: набряк, гідропічна дистрофія, збільшення кількості лімфатичних судин, які функціонують, із наявністю лімфангіектазій. Це може суттєво впливати на процеси фіброгенезу.

2. Доведено, що за умов ХАГ у печінці щурів прогресують явища жирової дистрофії печінки у поєднанні з гідропічною. Жирова дистрофія має осередковий характер, переважно дрібновакуольна, рідко – крупновокуольна. На відміну від гідропічної при ХТГ жирова дистрофія при ХАГ не впливала на архітекtonіку часточок і балкову орієнтацію гепатоцитів, що, на нашу думку, відіграє меншу роль у прогресуванні ХАГ, порівнюючи з гідропічною при ХТГ.

3. Характерною ознакою популяції гепатоцитів статевонезрілих щурів при ХТГ є збільшення плоідності ядерної ДНК  $>8c$  (у 2,2 раза,  $p < 0,01$ ), зменшення відсотка ядер в інтервалі  $G_0G_1$  (на 7,1%,  $p < 0,01$ ), збільшення – в S-фазі (на 58,3%,  $p < 0,05$ ), збільшення індексу проліферації (на 23,0%,  $p < 0,01$ ) і фрагментації ядерної ДНК (удвічі,  $p < 0,001$ ).

4. При ХАГ (на відміну від ХТГ) відбувається зменшення синтезу ДНК у ядрі (на 56,2 %,  $p < 0,01$ ), що, на нашу думку, може бути пов'язано зі специфічною антипроліферативною дією етанолу та потребує продовження вивчення. Фрагментація ядерної ДНК збільшується на 35% ( $p < 0,05$ ), поліплоїдизацію не спостерігали.

**Перспективи подальших досліджень** передбачають розкриття фундаментальних основ впливу гепатопротекторів на процеси, що відбуваються в ядрі гепатоцитів (зміна фаз клітинного циклу, фрагментація ДНК, плоідність набору ДНК). Це дасть можливість удосконалити патогенетичну терапію хронічних токсичних гепатитів у дітей різного віку, покращити прогноз і наслідки цієї патології, зменшити летальність.

## Список літератури

1. Гаврилук О.М. Особливості дуктулярної реакції при алкогольному, неалкогольному стеатогепатиті та вірусному гепатиті С за результатами імуногістохімічного дослідження / О.М. Гаврилук // Патологія. – 2014. – №1(30). – С. 41–44.
2. Экспериментальные и клинические аспекты применения энтеросорбции при хроническом токсическом гепатите / Ю.В. Бакширова, С.М. Тарабукина, Ж. Мутайхан и др. // Сибирский медицинский журнал. – 2007. – Т. 27. – №2(124). – С. 72–76.
3. Mutation in collagen-1 that confers resistance to the action of collagenase results in failure of recovery from  $CCl_4$ -induced liver fibrosis, persistence of activated hepatic stellate cells, and diminished hepatocyte regeneration / R. Issa, X. Zhou, N. Trim et al. // FASEB J. – 2003. – №17. – P. 47–49.
4. Беленічев І.Ф. Фармакологічна модуляція сигналіну апоптозу нейронів СА1-зони гіпокампа щурів з хронічною алкогольною інтоксикацією / І.Ф. Беленічев, О.П. Соколик, А.В. Абрамов // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2011. – Т. 25. – №6. – С. 15–21.
5. Рикало Н.А. Патент 43704 України, МПК (2009) G09B 23/00. Спосіб моделювання хронічного токсичного гепатиту та цирозу печінки у нестатевозрілих щурів / Н.А. Рикало, І.І. Незгода, В.А. Рауцкіс ; власник Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова. – № u200903490 // Бюл. №16.
6. Рикало Н.А. Патогенез хронічних вірусних гепатитів В і С у дітей: вікові особливості, патогенетична терапія (експериментально-клінічне дослідження) : автореф. дис. на здобуття наукового ступеня д.мед.н. : спец. 14.03.04 «Патологічна фізіологія» / Н.А. Рикало. – Тернопіль, 2011. – 36 с.
7. Ковалёв Г.А. Экспериментальная модель алкогольного поражения печени у самок крыс / Г.А. Ковалёв, А.Ю. Петренко // Вісник Харківського національного університету. – 2004. – №617. – С. 15–18.
8. Мушкамбаров Н.Н. Молекулярная биология : учебное пособие для студентов мед. вузов / Н.Н. Мушкамбаров, С.Л. Кузнецов. – М. : МИА, 2007. – 536 с.
9. Сравнительный анализ морфофункциональных показателей культуры гепатоцитов, выделенных из нормальной и патологически измененной печени крыс / Е.В. Байдюк, А.П. Ширяева, Н.Н. Безбородкина и др. // Цитология. – 2009. – Т. 51. – №10. – С. 797–805.
10. Gorla G.R. Polyploidy associated with oxidative injury attenuates proliferative potential of cells / G.R. Gorla, H. Malhi, S. Gupta // J. Cell Sci. – 2001. – Vol. 114. – P. 2943–2951.
11. Santiago T. Thyroid hormone regulation of rat hepatocytes proliferation and polyploidization / T. Santiago, B.P. Diaz, J.J. Cabrera et al. // Am. J. Physiology. – 1999. – Vol. 276. – P. 155–163.
12. Fogt F. Alterations in nuclear ploidy and cell phase distribution of rat liver cells in experimental alcoholic liver disease : relationship to antioxidant enzyme gene expression / F. Fogt, A.A. Nanji // Toxicology and applied pharmacology. – 1996. – Vol. 136. – Iss. 1. – P. 87–93.



## References

- Gavrilyuk, O. M. (2014). Osoblyvosti dukturnoi reaktsii pry alkoholnomu, nealkoholnomu steatohepatyti ta virusnomu hepatyti C za rezultatamy imunohistokhimichnoho doslidzhennia [Ductular reaction in alcoholic steatohepatitis, nonalcoholic steatohepatitis and hepatitis C virus infections (immunohistochemical study)]. *Patolohiia*, 1, 41–44. [in Ukrainian].
- Bashkirova, Yu. V., Tarabukina, S. M., Mutaikhan, G., Kolpakova, T. A., Kolpakov, M. A. (2007). Eksperimentalnye i klinicheskie aspekty primeneniya enterosorbtsii pri khronicheskom toksicheskom gepatite [Experimental and clinical aspects of enterosorbition in chronic toxic hepatitis]. *Sibirskij medicinskij zhurnal*, 2, 72–76. [in Russian].
- Issa, R., Zhou, X., Trim, N., Millward-Sadler, H., Krane, S., Benyon, C., & Iredale, J. (2003). Mutation in collagen-1 that confers resistance to the action of collagenase results in failure of recovery from CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis, persistence of activated hepatic stellate cells, and diminished hepatocyte regeneration. *FASEB J.*, 17, 47–49.
- Bielenichev, I. F., Sokolyk, A. P., & Abramov, A. V. (2011). Farmakologichna modulyatsiya signalingu apoptozu neyroniv SA1-zoni gipokampa schuriv z khronichnoyu alkoholnoyu intoksikatsiyeu [Pharmacological modulation of neuronal apoptosis syhnalinhu CA1 hippocampal zone rats with chronic alcohol intoxication]. *Pharmacology and drug toxicology*, 6, 15–21. [in Ukrainian].
- Rykalo, N. A., Neshoda, I. I., Rautskis, V. A. (2009). Ukraine Patent 43 704, IPC G09B 23/00. A method of modeling chronic toxic hepatitis and liver cirrhosis in rats immature; owner Vinnitsa National Medical University named after NI Pirogov. - № u200903490; *Bull.*, 16. [in Ukrainian].
- Rykalo, N. A. (2011). *Patohenez khronichnykh virusnykh hepatytiv V i S u ditei: vikovi osoblyvosti, patohenetychna terapiia (eksperymentalno-klinichne doslidzhennia)* (Avtoref. dis... dokt. med. nauk) [Pathogenesis of chronic viral hepatitis B and C in children: age, pathogenetic therapy (experimental and clinical research) Dr. med. sci. diss.] Ternopil, 36. [in Ukrainian].
- Kovalyev, G. A., & Petrenko, A. Yu. (2004). E'ksperimental'naya model' alkogol'nogo porazheniya pecheni u samok kryss [Experimental model of alcoholic liver diseases in female rats]. *Visnyk Kharkivskoho natsionalnoho universytetu*, 617, 15–18. [in Ukrainian].
- Mushkambarov, N. N. & Kuznetsov, S. L. (2007). *Molekulyarnaya biologiya : uchebnoe posobie dlya studentov med. vuzov [Molecular biology: a manual for students medical schools]*. Moscow: MIA. [in Russian].
- Baidyuk, E. V., Shiryayeva, A. P., Bezborodkina, N. N., & Sakuta, G. A. (2009). Sravnitel'nyj analiz morfofunktsional'nykh pokazatelej kul'tury gepatocitov, vydelennykh iz normal'noj i patologicheskoi izmenennoj pecheni kryss [Analysis of functioning and morphology hepatocytes of rats with experimental toxic hepatitis]. *Citologiya*, 51(10), 797–805.
- Gorla, G. R., Malhi, H. & Gupta, S. (2001). Polyploidy associated with oxidative injury attenuates proliferative potential of cells. *J. Cell Sci.*, 114, 2943–2951.
- Santiago, T., Diaz, B. P., Cabrera, J. J., Diaz-Chico, J. C., Diaz-Chico, B. N. & López-Guerra A. (1999). Thyroid hormone regulation of rat hepatocytes proliferation and polyploidization. *American Journal of Physiology*, (276). 155–163.
- Fogt, F. & Nanji, A. A. (1996). Alterations in nuclear ploidy and cell phase distribution of rat liver cells in experimental alcoholic liver disease : relationship to antioxidant enzyme gene expression. *Toxicology and applied pharmacology*, 136, 87–93.

### Відомості про авторів:

Рикало Н.А., д. мед. н., доцент, зав. каф. патологічної фізіології, Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова.  
Яровенко Л.О., ст. лаборант каф. патологічної фізіології, Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова,  
E-mail: yarovenk\_o@mail.ru.

### Сведения об авторах:

Рыкало Н.А., д. мед. н., доцент, зав. каф. патологической физиологии, Винницкий национальный медицинский университет им. Н.И. Пирогова.  
Яровенко Л.А., ст. лаборант каф. патологической физиологии, Винницкий национальный медицинский университет им. Н.И. Пирогова,  
E-mail: yarovenk\_o@mail.ru.

### Information about authors:

Rykalo N.A., MD, PhD, DSci, Vinnitsa National Pirogov Memorial Medical University.  
Yarovenko L.A., Senior Laboratory Assistant of the Department of Pathological Physiology, Vinnitsa National Pirogov Memorial Medical University,  
E-mail: yarovenk\_o@mail.ru.

Надійшла в редакцію 20.03.2015 р.

А. О. Макаrchук

## Морфологічна характеристика інволютивних змін епідермісу у хворих із маласезійною інфекцією шкіри обличчя

Запорізький державний медичний університет

**Ключові слова:** шкірні хвороби інфекційні, вікові фактори, ультраструктура.

Потребують з'ясування та наступного опрацювання питання про залежність патоморфологічних змін від вікових особливостей шкіри на тлі маласезійного ураження. З метою визначення ультраструктурних інволютивних змін епідермісу у хворих із маласезійною інфекцією здійснили морфологічне дослідження шкіри обличчя 90 пацієнтів, серед них 60 хворих на маласезіоз. Стан епідермісу визначали з використанням електронної мікроскопії. Встановили, що у хворих віком 33–40 років провідним порушенням шкіри обличчя є паракератозний гіперкератоз. У віковій групі 41–50 років найчастіше визначали епідермальний спонгіоз і лімфоцитарну інфільтрацію епідермісу. У пацієнтів віком 51–57 років переважають ушкодження проліферації та диференціювання кератиноцитів. Це свідчить про залежність патоморфологічних змін епідермісу внаслідок маласезійної інфекції від віку пацієнтів.

### Морфологическая характеристика инволютивных изменений эпидермиса у больных с малассезийной инфекцией кожи лица

А. А. Макаrchук

Требуют выяснения и дальнейшей разработки вопросы о зависимости патоморфологических изменений от возрастных особенностей кожи на фоне малассезийного поражения. С целью установления ультраструктурных инволютивных изменений эпидермиса у больных с малассезийной инфекцией провели морфологическое исследование кожи лица 90 пациентов, среди которых 60 больных малассезиозом. Состояние эпидермиса определяли с использованием электронной микроскопии. Установлено, что у больных в возрасте 33–40 лет ведущим нарушением кожи лица является паракератозный гиперкератоз. В возрастной группе 41–50 лет чаще всего определяли эпидермальный спонгиоз и лимфоцитарную инфильтрацию эпидермиса. У пациентов в возрасте 51–57 лет преобладают нарушения пролиферации и дифференцировки кератиноцитов. Это свидетельствует о зависимости патоморфологических изменений эпидермиса вследствие малассезийной инфекции от возраста пациентов.

**Ключевые слова:** кожные болезни инфекционные, возрастные факторы, ультраструктура.**Патология.** – 2015. – №1 (33). – С. 90–94

### Morphological characteristics of involutive changes of epidermis in patients with malasseziasis of facial skin

А. О. Макаrchук

Many questions about the dependence of age-appropriate pathological changes of the skin on background malassezia destruction require clarification and further advance.

**Aim.** In 90 patients with involutive changes in facial skin, including 60 patients with malasseziasis, determination of the state of the epidermis was carried out using electron microscopy.

**Methods and results.** It was found that in 33–40 years old patients leading violation of facial skin is hyperkeratosis. In the age group of 41–50 years epidermal spongiosis and lymphocytic infiltration of the epidermis are in the foreground. In patients aged 51–57 years damage of proliferation and differentiation of keratinocytes predominates.

**Conclusion.** This shows the dependence of epidermis pathological changes during malasseziasis on age.

**Key words:** Skin Diseases, Infectious, Age Factors.**Pathologia.** 2015; №1 (33): 90–94

Доцільність використання морфологічних даних для вибору методів лікування пацієнтів з інволютивними та патологічними змінами шкіри – відомий та обґрунтований факт [1,2]. У сучасній дерматології саме морфологічні критерії виявляються найбільш адекватними для оцінювання структурно-функціонального стану тканин [3], але не розроблені питання індивідуального оцінювання шкірних покривів з урахуванням маласезійного ушкодження. Поодинокими залишаються ультраструктурні дослідження структури зміненої шкіри [4].

За даними досліджень, що здійснені в людини та теплокровних тварин, маласезії можна візуалізувати у зроговілому шарі епідермісу за допомогою дослідження зразків шкірної біопсії, яка показала характерні

патоморфологічні риси – гіперплазію епідермісу та міжклітинний набряк, а також змішаний поверхневий периваскулярний інфільтрат із мононуклеарних клітин, нейтрофілів, еозинофілів [5]. У деяких випадках мікробіоту, яку цитологічно ідентифікували, не виявляють у гістологічних зрізах. Отже, ідентифікація маласезії потребує продовження досліджень і має спонукати до пробної терапії, але недостатня візуалізація цього кератомікозу в гістопатологічних зрізах також не виключає його наявності та потенційного значення [6].

Нині розроблена доволі детальна мікробіологічна характеристика грибів *Malassezia* та їхніх властивостей при взаємодії зі шкірою під час розвитку патології, проте обмеженою залишається інформація про морфологічні

зміни шкіри за умов індукції маласезіозу. Відсутні відомості про залежність патоморфологічних змін від вікових особливостей шкіри на тлі маласезійного ураження.

### Мета роботи

Визначення ультраструктурних інволютивних змін епідермісу хворих із маласезійною інфекцією шкіри обличчя.

### Пацієнти і методи дослідження

Морфологічне дослідження шкіри обличчя здійснили в 90 осіб з інволютивними змінами шкіри (усі – жінки). Пацієнтів диференціювали на 3 вікові групи, які формували згідно з рекомендаціями [7]: 33–40 років – 18 хворих на маласезіоз шкіри обличчя та 9 пацієнтів контрольної групи); 41–50 років – 27 хворих на маласезіоз і 14 пацієнтів контрольної групи; 51–57 років – 15 хворих на маласезіоз і 7 пацієнтів контрольної групи.

Для ультраструктурного аналізу епоксидні блоки матеріалу шкіри виготовляли з використанням композиції епон-аралдит. Ультратонкі зрізи одержували на ультрамікромомі УМТП-6М («SELMI», Україна). Дослідження здійснили за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа ПЭМ-100-01 («SELMI», Україна) при напрузі прискорення 75–80 кВ і первинних збільшеннях від 1500 до 8000 за стандартною схемою [8,9]. Ультраструктурне дослідження виконали на базі лабораторії електронної мікроскопії (зав. – професор І.В. Твердохліб) ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України».

Використовуючи програмний пакет ImageJ 1,47v і загальні принципи морфометричного аналізу [10,11], вивчали загальну товщину базального, остистого та зернистого шарів епідермісу, чисельну щільність ядер кератиноцитів, мітотичний індекс і ступінь вакуолізації кератиноцитів гермінативної зони.

Статистично результати опрацювали з використанням пакетів ліцензійних програм Statistica 6.1 (серійний № AGAR909E415822FA). Вірогідність відмінностей між вибірками визначали з урахуванням парного t-критерію Стьюдента, а також непараметричного критерію Вілкоксона у разі відсутності нормального статистичного розподілу. Відповідність розподілу величин нормальному (Гауса) оцінили за допомогою визначення коефіцієнтів ексцесу й асиметрії з використанням відповідних таблиць. Необхідний обсяг вибірки у групах дослідження встановлювали за формулою [12]:

$$n = \frac{t^2 s_x^2}{\Delta^2}$$

де n – чисельність вибірки; t – нормоване відхилення, з яким пов'язаний той чи інший рівень значущості;  $s_x$  – вибіркова дисперсія;  $\Delta$  – величина, що визначає межі довірчого інтервалу.

### Результати та їх обговорення

За даними морфологічного дослідження, у хворих віком 33–40 років із діагностованим маласезіозом спостерігали істотне зниження загальної товщини гермінативної зони епідермісу як в ушкодженій

інфекцією ділянки шкіри обличчя (на 34,1%;  $p < 0,05$ ), так і клінічно здорових ділянках шкіри (на 36,4%;  $p < 0,05$ ). Це свідчило про системний характер зменшення загальної товщини базального, остистого та зернистого шарів епідермісу хворих на маласезіоз незалежно від того, клінічно ушкодженою є ділянка шкіри чи ні (табл. 1).

Таблиця 1

### Загальна товщина базального, остистого та зернистого шарів епідермісу, мкм (M±m)

Вік	Контрольна група	Хворі на маласезіоз шкіри обличчя	
		Неушкоджена ділянка	Ушкоджена ділянка
33–40 років	53,6±5,9	34,1±4,4*	35,3±4,2*
41–50 років	50,3±4,8	31,6±4,1*	46,7±4,3**
51–57 років	41,2±3,2	26,5±3,2*	35,2±3,9**

Примітки: \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з контрольною групою; \*\* –  $p < 0,05$  порівнюючи неушкоджену й ушкоджену ділянки шкіри.

У пацієнтів, які ввійшли у вікову групу 41–50 років, товщина гермінативної зони епідермісу в ушкоджених ділянках шкіри вірогідно не поступалася відповідному показнику осіб контрольної групи, але в більшості спостережень визначили виражені явища міжклітинного набряку остистого та шипуватого шарів. У клінічно неушкоджених ділянках шкіри цей параметр вірогідно поступався контрольному показнику (на 37,2%;  $p < 0,05$ ). Аналогічні за напрямом зміни спостерігали у хворих віком 51–57 років. Названі зміни вказують, що в ушкоджених кератомікозом ділянках відбувається потовщення гермінативної зони епідермісу не завдяки наближенню клітинної маси до контрольного рівня, а внаслідок розвитку явищ спонгіозу з переважаючим міжклітинним набряком.

Визначення чисельної щільності ядер кератиноцитів гермінативних шарів епідермісу не виявило суттєвих відмінностей клінічно неушкодженої шкіри обличчя хворих на маласезіоз від значень контрольної групи в жодній із вікових груп (табл. 2). У всіх хворих виявили вірогідно знижені параметри ушкоджених ділянок шкіри щодо контрольних значень відповідних за віком груп: у пацієнтів 33–40 років – на 27,3% ( $p < 0,05$ ), 41–50 років – на 28,2% ( $p < 0,05$ ), 51–57 років – на 33,7% ( $p < 0,05$ ).

Таблиця 2

### Чисельна щільність ядер кератиноцитів гермінативних шарів епідермісу, $10^3 \times \text{мм}^{-2}$ (M±m)

Вік	Контрольна група	Хворі на маласезіоз шкіри обличчя	
		Неушкоджена ділянка	Ушкоджена ділянка
33–40 років	0,77±0,09	0,73±0,09	0,56±0,12**
41–50 років	0,85±0,12	0,83±0,11	0,61±0,14**
51–57 років	0,98±0,17	0,93±0,19	0,65±0,15**

Примітки: \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з контрольною групою; \*\* –  $p < 0,05$  порівнюючи неушкоджену й ушкоджену ділянки шкіри.

Аналіз мітотичної активності кератиноцитів показав, що клінічно здорові ділянки шкіри обличчя незалежно від віку пацієнтів із маласезіозом не відрізнялися статистично значущо від показників контрольної групи (табл. 3), але в ушкодженій шкірі мітотичний індекс епітелію значно поступався показникам здорової шкіри. Так, у хворих віком 33–40 років – на 30,4% ( $p < 0,05$ ), 41–50 років – на 48,5% ( $p < 0,05$ ), 51–57 років – на 49,3% ( $p < 0,05$ ). Ці дані свідчать про супресорний вплив маласезійної інфекції на проліферативну активність кератиноцитів.

Таблиця 3  
Мітотичний індекс кератиноцитів, % ( $M \pm m$ )

Вік	Контрольна група	Хворі на маласезіоз шкіри обличчя	
		Неушкоджена ділянка	Ушкоджена ділянка
33–40 років	2,63±0,32	2,40±0,27	1,67±0,23* <sup>**</sup>
41–50 років	2,43±0,24	2,35±0,31	1,21±0,19* <sup>**</sup>
51–57 років	2,07±0,21	2,11±0,30	1,07±0,22* <sup>**</sup>

Примітки: \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з контрольною групою; \*\* –  $p < 0,05$  порівнюючи неушкоджену й ушкоджену ділянки шкіри.

В ушкоджених маласезіозом ділянках шкіри пацієнтів у складі базальних кератиноцитів спостерігали прояви деструкції мітохондріальних крист, ознаки порушення міжклітинних контактних структур остистого та зернистого шарів епідермісу, порушення тонофіламентозної структури епідермісу, виразний міжклітинний набряк. У поодиноких випадках виявляли апоптотично змінені кератиноцити (рис. 1). Ступінь ультраструктурних порушень епідермісу підвищувався з віком хворих (рис. 2, 3).

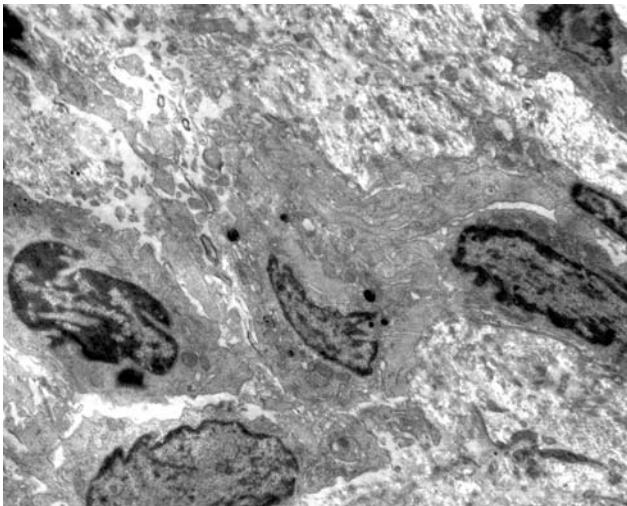


Рис. 1. Ділянка ушкодженої маласезіозом шкіри обличчя пацієнтки віком 36 років. Гермінативна зона епідермісу. Електроннограма.  $\times 5000$ .

Морфометричний підрахунок клітин, що мають вакуолізовану цитоплазму, виявив закономірне збільшення їхнього числа з віком у контрольній групі. У хворих на маласезіоз виявили істотне переважання таких клітин як у клінічно здорових ділянках шкіри обличчя, так і в ушкоджених кератомікозом зонах (у середньому май-

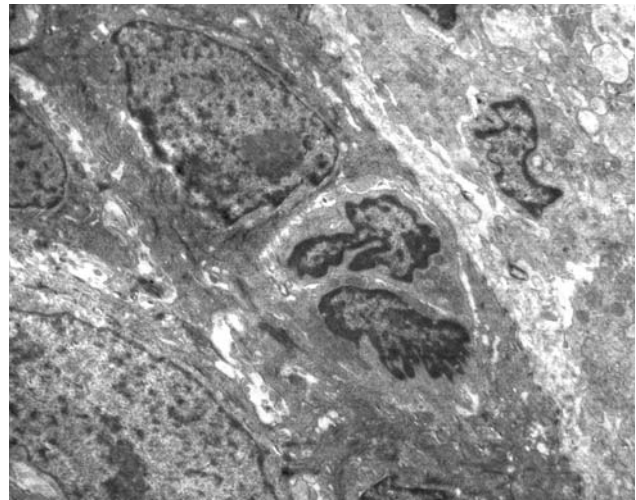


Рис. 2. Ділянка ушкодженої маласезіозом шкіри обличчя пацієнтки віком 44 роки. Гермінативна зона епідермісу. Електроннограма.  $\times 5000$ .

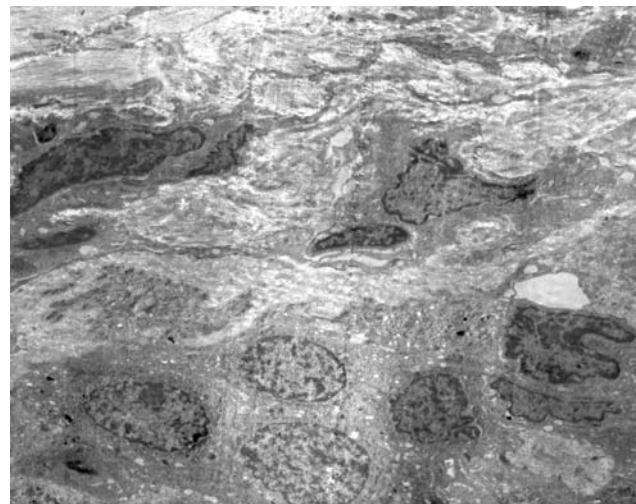


Рис. 3. Ділянка ушкодженої маласезіозом шкіри обличчя пацієнтки віком 55 років. Гермінативна зона епідермісу. Електроннограма.  $\times 4000$ .

же двічі). Статистично значущих відмінностей між ураженими та неураженими ділянками шкіри обличчя не визначили в жодній із вікових груп. Це свідчить про системний характер порушень епідермального гомеостазу при маласезійній інфекції (табл. 4).

Таблиця 4  
Ступінь вакуолізації кератиноцитів гермінативної зони, % ( $M \pm m$ )

Вік	Контрольна група	Хворі на маласезіоз шкіри обличчя	
		Неушкоджена ділянка	Ушкоджена ділянка
33–40 років	0,53±0,21	0,98±0,21*	1,21±0,10*
41–50 років	2,97±0,68	4,22±0,57*	4,83±0,72*
51–57 років	4,22±1,08	8,56±1,18*	9,32±1,32*

Примітки: \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з контрольною групою.

У результаті дослідження ушкоджених ділянок шкіри визначили, що у пацієнтів віком 33–40 років із маласезіозом ділянки обличчя найбільше були виражені

явища гіперкератозу за паракератозним типом (77,8% пацієнтів), менше – спонгіоз гермінативної зони (44,4% спостережень), лімфоцитарна інфільтрація епідермісу (38,9%) і гіперплазія кератиноцитів (33,3% спостережень). У невеликій кількості пацієнтів у зоні ушкодженої шкіри обличчя спостерігали прояви запальних процесів у зоні шкірних залоз, пригнічення активності макрофагів, а також ушкодження проліферації та диференціювання кератиноцитів (табл. 5).

Таблиця 5

**Частота типових патоморфологічних змін у ділянках ушкодженої шкіри обличчя хворих на маласезіоз у вікових групах**

Морфологічні ознаки	Вікові групи		
	33–40 років (n=18)	41–50 років (n=27)	51–57 років (n=15)
Гіперкератоз	77,8%	55,6%	46,7%
Спонгіоз	44,4%	85,2%	60,0%
Периваскулярна інфільтрація	66,7%	51,9%	46,7%
Епідермальна інфільтрація	38,9%	74,1%	53,3%
Фолікуліт	16,7%	11,1%	-
Гіперплазія епідермісу	33,3%	22,2%	-
Пригнічення макрофагоцитозу	27,8%	48,1%	73,3%
Ушкодження проліферації та диференціювання кератиноцитів	16,7%	33,3%	86,7%

У віковій групі 41–50 років явища гіперкератозу спостерігали більш ніж у половини пацієнтів із маласезійною інфекцією, проте найчастіше визначали епідермальний спонгіоз (85,2%) і лімфоцитарну інфільтрацію епідермісу (74,1%). Майже в половини цього контингенту хворих (48,1%) виявили пригнічення макрофагоцитозу.

В осіб віком 51–57 років, у яких діагностували маласезіоз, переважали ушкодження проліферації та диференціювання кератиноцитів (86,7%), зберігалися явища спонгіозу (60,0%), імунореактивність епідермісу знижувалась у порівнянні з попередньою віковою групою, прояви фолікуліту та гіперпластичних процесів епідермісу не виявили.

**Висновки**

1. Морфологічним субстратом розвитку маласезіозу шкіри обличчя є порушення гомеостазу епідермісу та структури керато-дермального з'єднання шкіри. Спектр патоморфологічних змін унаслідок маласезійної інфекції залежить від віку пацієнтів.

2. У хворих віком 33–40 років провідним порушенням шкіри обличчя є паракератозний гіперкератоз. У віковій групі 41–50 років найчастіше виявляли епідермальний спонгіоз і лімфоцитарну інфільтрацію епідермісу. У пацієнтів віком 51–57 років переважали ушкодження проліферації та диференціювання кератиноцитів.

**Перспективи подальших досліджень** пов'язані з вивченням впливу специфічної антимікотичної терапії на структуру шкіри хворих на маласезіоз у різних вікових групах.

**Список літератури**

- Jiang L.I. SWIRL, a clinically validated, objective, and quantitative method for facial wrinkle assessment / L.I. Jiang, T.J. Stephens, R. Goodman // *Skin Res Technol.* – 2013. – Vol. 19(4). – P. 492–498.
- The anatomical basis for wrinkles / J.E. Pessa, H. Nguyen, G.B. John, P.E. Scherer // *Aesthet Surg J.* – 2014. – Vol. 34(2). – P. 227–234.
- Forehead wrinkles: a histological and immunohistochemical evaluation / M. El-Domyati, W. Medhat, H.M. Abdel-Wahab et al. // *J Cosmet Dermatol.* – 2014. – Vol. 13(3). – P. 188–194.
- Ultrastructural changes in photorejuvenation induced by photodynamic therapy in a photoaged mouse model / J.Y. Park, Y.H. Jang, Y.S. Kim et al. // *Eur J Dermatol.* – 2013. – Vol. 23(4). – P. 471–477.
- Грибы рода *malassezia* в заболеваниях животных: клинические формы, диагностика / Р.С. Овчинников, М.Г. Маноян, А.Г. Гайнуллина и др. // *VetPharma.* – 2013. – №3(14). – С. 36–52.
- Prevalence of *Malassezia* species associated with seborrheic dermatitis lesions in patients in Argentina / M.L. Sosa, F. Rojas, M. Mangiaterra, G. Giusiano // *Rev Iberoam Micol.* – 2013. – Vol. 30(4). – P. 239–242.
- Морфология человека : учебное пособие / под ред. Б.А. Никитюка, В.П. Чтецова. – 2-е изд., перераб. доп. – М. : Изд-во МГУ, 1990. – 368 с.
- Миронов А.А. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине : методическое руководство / А.А. Миронов, Я.Ю. Комиссарчик, В.А. Миронов. – СПб. : Наука, 1994. – 400 с.
- Kuo J. Electron microscopy: methods and protocols / J. Kuo.

- Totowa ; New Jersey : Humana Press Inc., 2007. – 608 p.
- Авгандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. Руководство / Г.Г. Авгандилов. – М. : Медицина, 1990. – 384 с.
- Current microscopy contributions to advances in science and technology / A. Méndez-Vilas, N.N. Rigoglio, M.V. Mendes Silva et al. – Badajoz : Formatec, 2012. – 1523 p.
- Лакин Г.Ф. Биометрия : учеб. пособие для биол. спец. вузов. / Г.Ф. Лакин. – 4-е изд., перераб. и доп. – М. : Высшая школа, 1990. – 352 с.

**References**

- Jiang, L. I., Stephens, T. G. & Goodman, R. (2013) SWIRL, a clinically validated, objective, and quantitative method for facial wrinkle assessment. *Skin Res Technol*, 19(4), 492–498. doi: 10.1111/srt.12073.
- Pessa, J. E., Nguyen, H., John, G. B. & Scherer, P. E. (2014) The anatomical basis for wrinkles. *Aesthet Surg J*, 34(2), 227–234. doi: 10.1177/1090820X13517896
- El-Domyati, M., Medhat, W., Abdel-Wahab, H. M., Mofteh, N. H., Nasif, G. A., & Hosam, W. (2014) Forehead wrinkles: a histological and immunohistochemical evaluation. *J Cosmet Dermatol*, 13(3), 188–194. doi: 10.1111/jocd.12097.
- Park, J. Y., Jang, Y. H., Kim, Y. S., Sohn, S., & Kim, Y. C. (2013) Ultrastructural changes in photorejuvenation induced by photodynamic therapy in a photoaged mouse model. *Eur J Dermatol*, 23(4), 471–477. doi: 10.1684/ejd.2013.2050.
- Ovchinnikov, R. S., Manoyan, M. G., Gaynullina, A. G. Panin, A. N., & Ershov, P. P. (2013) Griby roda *malassezia* v zabolevaniyakh zhivotnykh: klinicheskie formy, diagnostika [Fungi of genus *malassezia* in animal diseases: clinical manifestations, diagnosis and treatment]. *VetPharma*, 3(14), 36–52. [in Russian].

- 
6. Sosa, M. L., Rojas, F., Mangiaterra, M. & Giusiano G. (2013) Prevalence of Malassezia species associated with seborrheic dermatitis lesions in patients in Argentina. *Rev Iberoam Micol*, 30(4), 239–242. doi: 10.1016/j.riam.2013.02.002.
  7. Nikityuk, B. A. & Chtecov, V.P. (Ed). (1990) *Morfologiya cheloveka [Human morphology]*. Moscow: Izd-vo MGU. [in Russian].
  8. Mironov, A. A., Komissarchik, Ya. Yu. & Mironov, V. A. (1994) *Metody e`lektronnoj mikroskopii v biologii i medicine [Electron microscopy methods in biology and medicine]*. Saint Petersburg: Nauka. [In Russian].
  9. Kuo, J. (2007) *Electron microscopy: methods and protocols*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.
  10. Avtandilov, G. G. (1990) *Medicinskaya morfometriya. Rukovodstvo [Medical morphometry: Guide]*. Moscow: Meditsina. [in Russian].
  11. Méndez-Vilas, A, Rigoglio, N. N., Mendes Silva, M. V., et al. (2012) *Current microscopy contributions to advances in science and technology*. Badajoz: Formatex.
  12. Lakin, G. F. (1990) *Biometriya [Biometrics]*. Moscow: Vysshaya shkola. [in Russian].
- 

**Відомості про автора:**

Макарчук А.О., клінічний ординатор каф. дерматології та венерології, Запорізький державний медичний університет,  
E-mail: makarchuk.art@gmail.com.

**Сведения об авторе:**

Макарчук А.А., клинический ординатор каф. дерматологии и венерологии, Запорожский государственный медицинский университет,  
E-mail: makarchuk.art@gmail.com.

**Information about author:**

Makarchuk A.O., Clinical Intern of the Department of Dermatovenereology, Zaporizhzhia State Medical University, E-mail: makarchuk.art@gmail.com.

---

Надійшла в редакцію 27.03.2015 р.

А. В. Капшитарь

## Морфология желчного пузыря у больных острым холециститом, удаленного из минидоступа

Запорожский государственный медицинский университет

**Ключевые слова:** острый холецистит, болезни желчного пузыря, малоинвазивные вмешательства, гистопатология.

Острый холецистит – наиболее частая патология среди острых хирургических заболеваний органов брюшной полости. Целью исследования являлось изучение морфологических форм острого холецистита и сопоставление их с гистологическим заключением. Правосторонний трансректальный продольный минидоступ выполнен у 134 пациентов, интраоперационно у 22 (16,4%) больных определена катаральная форма холецистита, у 62 (46,3%) – флегмонозная, у 50 (37,3%) – гангренозная. Диагноз острого холецистита подтвержден гистологически у 11 (82,8%) пациентов, гипердиагностика имела место у 23 (17,2%). Совпадение форм холецистита установлено у 90 (67,2%) больных, гипердиагностика – у 36 (26,8%), гиподиагностика – у 8 (6%). Это свидетельствует об ограниченных возможностях визуальной оценки изменений в желчном пузыре.

### Морфологія жовчного міхура у хворих на гострий холецистит, що видалений із мінідоступу

О. В. Капшитарь

Гострий холецистит є найбільш частою патологією серед гострих хірургічних хвороб органів черевної порожнини. Мета роботи полягала у вивченні морфологічних форм гострого холециститу та порівнянні їх із гістологічним висновком. Правосторонній трансректальний подовжній мінідоступ виконали у 134 пацієнтів, інтраопераційно у 22 (16,4%) хворих виявили катаральну форму холециститу, у 62 (46,3%) – флегмонозну, у 50 (37,3%) – гангренозну. Діагноз гострого холециститу підтверджений гістологічно в 11 (82,8%) пацієнтів, гіпердіагностика була у 23 (17,2%). Збіг форм холециститу визначили у 90 (67,2%) хворих, гіпердіагностика – у 36 (26,8%), гіподіагностика – у 8 (6%). Це свідчить про обмежені можливості візуального оцінювання змін у жовчному міхурі.

**Ключові слова:** гострий холецистит, хвороби жовчного міхура, малоінвазивні втручання, гістопатологія.

**Патологія.** – 2015. – №1 (33). – С. 95–98

### Morphology of the ablated gall-bladder from the short-scar incision in patients with acute cholecystitis

A. V. Kapshitar

**Aim.** Acute cholecystitis is the most frequent pathology among the acute surgical diseases of abdominal cavity organs. The aim of the research was the investigation of morphological forms of acute cholecystitis and their comparison with histological conclusion.

**Methods and results.** The right transrectal longitudinal short-scar incision was implemented in 134 patients and intraoperatively in 22 (16,4%) patients the catarrhal form of cholecystitis, in 62 (46,3%) – phlegmonous form and in 50 (37,3%) – gangrenal one were confirmed.

Diagnosis of acute cholecystitis was histologically confirmed in 11 (82,8%) patients, overdiagnostics took place in 23 (17,2%). Coincidence of forms of cholecystitis was in 90 (67,2%) patients, overdiagnostics was in 36 (26,8%) and underdiagnostics – in 8 (6%).

**Conclusion.** This demonstrates that visual methods are limited for estimation of changes in the gall-bladder.

**Key words:** Acute Cholecystitis, Minimally Invasive Surgical Procedures, Gallbladder Diseases, Histopathology.

**Pathologia.** 2015; №1 (33): 95–98

Острый холецистит остается наиболее частой ургентной хирургической абдоминальной патологией, составляя около 15% по отношению ко всем острым хирургическим заболеваниям органов брюшной полости [4,8]. Столь высокая частота данного заболевания объясняется ростом желчнокаменной болезни и продолжительности жизни населения [6]. Острым холециститом заболевают чаще люди старше 50 лет. Пациенты пожилого и старческого возраста составляют 50% от общего числа больных. Соотношение мужчин и женщин составляет 1:5 [3,6]. В США 10–20% взрослого населения страдает желчнокаменной болезнью, из которых у 1/3 течение осложняется развитием различных форм острого холецистита [7].

Со времени выполнения первой успешной холецистэктомии в Германии в 1882 г. Карлом Лангенбухом и

до настоящего времени она остается методом выбора в лечении острого холецистита [1,4,5,8–10]. Однако сейчас в арсенале хирурга имеются различные оперативные доступы к желчному пузырю (традиционная лапаротомия, минидоступ, лапароскопический доступ) [1–5,8,9]. Результаты интраоперационной диагностики острого холецистита свидетельствуют о значительном превалировании его деструктивных форм – от 80,5% до 97,2% [2,4]. После холецистэктомии обязательно гистологическое исследование желчного пузыря [1–9].

Проблеме острого холецистита уделяется большое внимание [1,4,5,7–9]. Длительное время занимаясь диагностикой и лечением больных острым холециститом, мы обратили внимание, что его клинические формы не всегда соответствуют гистологическому заключению. В доступной специализированной литературе не нашли

работ, авторы которых изучали бы точность интраоперационной диагностики острого холецистита и его форм по результатам гистологических исследований после холецистэктомии из минидоступа, в связи с чем считаем данное исследование актуальным.

### Цель работы

Изучить патоморфологические формы холецистита и их частоту в удаленном желчном пузыре из минидоступа у пациентов с острым холециститом и сопоставить с результатами клинического диагноза.

### Пациенты и методы исследования

В хирургическом отделении КП «Городская клиническая больница №2» (база кафедры общей хирургии ЗГМУ) за период 2012–2014 гг. у 134 больных острым калькулезным холециститом выполнена холецистэктомия из минидоступа. Мужчин было 36 (26,9%), женщин – 98 (73,1%); возраст пациентов – от 26 до 88 лет. Преобладали больные в возрасте от 51 до 80 лет – 107 (79,9%). Все страдали сопутствующими заболеваниями сердечно-сосудистой системы, легочной, церебральной, пищеварительной, мочеполовой и др. Ранее в сроки от 2 до 60 лет оперированы 48 (35,8%) пациентов. До 6 часов от начала заболевания госпитализированы 18 (13,4%) больных, от 6 до 24 часов – 37 (27,6%), в течение 2–3 суток – 49 (36,6%), 4–6 суток – 19 (14,2%), 7–10 суток – 5 (3,7%), 11–12 суток – 2 (1,5%), 14–20 суток – 3 (2,2%), 2 месяца – 1 (0,8%).

После обследования, кратковременной предоперационной подготовки или неэффективной консервативной терапии установлены показания к оперативному лечению. В сроки до 6 часов после госпитализации оперированы 8 (6%) пациентов, 6–24 часа – 83 (61,9%), в течение 1–2 суток – 30 (22,4%), 3 суток – 6 (4,5%), 4–7 суток – 7 (5,2%) больных. Холецистэктомия осуществлена от шейки из правостороннего трансректального продольного минидоступа. Из всех больных с острым холециститом у 22 (16,4%) пациентов макроскопически диагностирована катаральная, у 62 (46,3%) – флегмонозная, у 50 (37,3%) – гангренозная форма.

После удаления желчного пузыря его помещали в емкость, где фиксировали в 10% растворе формалина. Для морфологической диагностики форм острого холецистита осуществляли забор 4 кусочков тканей из стандартных областей желчного пузыря. Из них 2 кусочка тканей забирали из шейки желчного пузыря на расстоянии 1 см между ними, по 1 кусочку – из области тела и дна. Готовили микропрепараты из изъятых кусочков тканей, окрашивали гематоксилином и эози-

ном и проводили микроскопию, используя микроскоп Axioplant 2 фирмы Karl Zeiss (ФРГ) при увеличении ×40–60. В случае необходимости использования дополнительных фокусов тканей желчного пузыря, например при подозрении на полип, фиброму либо на наличие иного патологического образования, проводили забор из данного участка тканей для последующего микроскопического исследования.

### Результаты и их обсуждение

После получения результатов гистологического исследования желчных пузырей, их анализа и проведения сравнительной оценки с клиническим диагнозом и формами острого холецистита всех 134 оперированных пациентов разделили на две группы.

В I группу включили 59 (44%) больных, у которых было совпадение диагноза острого холецистита по данным гистологического заключения, однако полного совпадения форм не установлено (*табл. 1*).

Данные таблицы показывают: по результатам гистологического заключения удаленных желчных пузырей наиболее высокая точность совпадения с клиническим диагнозом была при гангренозной (94,1%) и флегмонозной (87,1%) формах острого холецистита, наиболее низкая – при катаральной форме (72,7%).

Точность гиподиагностики клинических форм холецистита также различна. Наиболее высокой она была при катаральной форме (27,3%), наиболее низкой – при флегмонозной (9,7%). Гипердиагностика при клинически установленной гангренозной форме отмечена у 5,9% пациентов, при флегмонозной – в 3,2% случаев.

II группу составили 75 (56%) больных, у которых при клиническом диагнозе острого холецистита в ходе гистологического исследования отмечены хронические формы холецистита либо развитие острого холецистита на фоне хронического (*табл. 2*).

Представленные результаты свидетельствуют, что в подгруппе пациентов с клинически установленной катаральной формой холецистита у всех 11 больных имел место хронический холецистит, сочетающийся с аденоматозной полифокальной очаговой гиперплазией стенки желчного пузыря либо папилломатозной гиперплазией слизистой оболочки с кистой (6 пациентов), хроническим холециститом в стадии обострения без определения степени (4 больных) и хроническим холециститом вне обострения, проявляющимся фиброзом стенки желчного пузыря и васкуляризацией сосудов (1 случай).

В подгруппе больных с клиническим диагнозом флегмонозной формы острого холецистита при гистологическом исследовании у большинства – 20 (69%) пациентов

Таблица 1

### Результаты совпадения клинического и гистологического диагнозов острого холецистита и его форм

Клинический диагноз формы острого холецистита	Гистологическое заключение (форма острого холецистита)			Число больных	
	Катаральная	Флегмонозная	Гангренозная	абс.	%
Катаральная	8	3	-	11	18,6
Флегмонозная	1	27	3	31	52,6
Гангренозная	-	1	16	17	28,8
Итого	9	31	19	59	100,0



**Сравнение клинических форм острого холецистита в группе обнаруженных форм хронического холецистита при гистологическом исследовании**

Клинический диагноз формы острого холецистита	Патологические изменения желчного пузыря на фоне его хронического воспаления				Число больных	
	Вне обострения, период обострения, аденоматоз, папилломатоз	Флегмонозный холецистит	Гангренозный холецистит	Аденокарцинома	абс.	%
Катаральная	11	-	-	-	11	14,6
Флегмонозная	7	20	1	1	29	38,7
Гангренозная	4	12	19	-	35	46,7
Итого	22	32	20	1	75	100,0

– диагностировано совпадение формы холецистита; у 7 (24,1%) имели место разнообразные хронические патологические изменения желчного пузыря (выраженная атрофия слизистой оболочки, ее аденоматоз, папилломатозная гиперплазия с кистой, полифокальная очаговая гиперплазия стенки желчного пузыря, единичные фокусы кистозно расширенных желез и хронический холецистит в стадии обострения). Гиподиагностика отмечена у 1 (3,5%) больного с гангренозной формой, а также у 1 (3,5%) пациента, страдающего аденокарциномой желчного пузыря.

У пациентов с клинически установленной гангренозной формой острого холецистита чаще отмечено совпадение с гистологическим заключением – 19 (54,3%) больных. У 16 (45,7%) пациентов имела место гиподиагностика; флегмонозная форма гистологически определена у 12 (34,3%) больных, катаральная – у 4 (11,4%).

Следовательно, из 75 пациентов при клинически установленном диагнозе катаральной формы острого холецистита у всех обследованных гистологически отмечены лишь разнообразные хронические изменения в

желчном пузыре. Точный диагноз гангренозной формы установлен у 54,3% больных, флегмонозной – у 69%, у остальных патология представлена гипо- или гипердиагностикой.

#### Выводы

1. После холецистэктомии из минидоступа у больных острым холециститом клинически катаральная форма отмечена у 22 (16,4%), флегмонозная – у 62 (46,3%), гангренозная – у 50 (37,3%) пациентов.

2. Клинический диагноз острого холецистита подтвержден при гистологическом исследовании у 111 (82,8%) больных, гипердиагностика имела место у 23 (17,2%).

3. Совпадение форм острого холецистита по результатам клинического и гистологического исследований отмечено у 90 (67,2%) пациентов, гипердиагностика – у 36 (26,8%), гиподиагностика – у 8 (6%) больных.

**Перспективы дальнейших исследований.** Продолжение накопления клинического материала и проведение последующего сравнительного анализа с результатами гистологических исследований.

#### Список литературы

- 18-летний опыт лапароскопической холецистэктомии / М.Е. Ничитайло, А.Н. Литвиненко, П.В. Огородник и др. // Сучасні медичні технології. – 2011. – №3–4(11–12). – С. 281–285.
- Капшитарь А.В. Опыт применения минилапаротомного доступа в хирургическом лечении больных острым холециститом / А.В. Капшитарь // Сучасні медичні технології. – 2011. – №3–4(11–12). – С. 140–143.
- Клинико-морфологическая классификация острого холецистита [Электронный ресурс]. – Режим доступа: lektsiopedia.org.
- Лупальцов В.И. Современные подходы к тактике выбора оперативного лечения острого холецистита / В.И. Лупальцов, А.И. Ягнюк, И.А. Дехтярук // Сучасні медичні технології. – 2011. – №3–4(11–12). – С. 211–213.
- Малоинвазивные технологии в хирургии желчнокаменной болезни, осложнённой механической желтухой / А.С. Никоненко, Н.Г. Головкин, В.А. Грушка и др. // Патологія. – 2013. – №2(28). – С. 4–7.
- Острый холецистит [Электронный ресурс]. – Режим доступа: medbe.ru.
- Острый и хронический калькулёзный холецистит [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.smed.ru.
- Рамазонава А.Р. Холецистэктомия из минилапаротомного доступа у больных старше 60 лет : автореф. дис. на соискание ученой степени к.мед.н. : спец. 14.01.17 «Хирургия» / А.Р. Рамазонава ; Рос. ун-т дружбы народов. – М., 2012. – 21 с.
- Сучасні напрямки лікування гострого холециститу / В.В. Хацко, О.Д. Шаталов, Ф.А. Греджев, В.О. Спіфанцев // Шпитальна хірургія. – 2013. – №3. – С. 123–124.
- Langenbuch C. Ein Fall von Extirpation der Gallenbase wegen Cholelithiasis / C. Langenbuch // Heil Beri Klin Woschenschr. – 1882. – Vol. 19. – P. 725–727.

#### References

- Nichitajlo, M. E., Litvinenko, A. N., Ogorodnik, P. V., Dyazenko, V. V., Skums, A. V., Kondratyuk, A. P., et al. (2011). 18-letnij opyt laparoskopicheskoy kholeciste'ktomii [Eighteen-year experience of laparoscopic cholecystectomy]. *Suchasni medychni tekhnolohii*, 3–4, 281–285. [in Ukrainian].
- Kapschitar', A. V. (2011) Opyt primeneniya minilaparotomnogo dostupa v khirurgicheskom lechenii bol'nykh ostrym kholecistitom [Experience of using mini laparoscopic approach in the surgical treatment of patients with acute cholecystitic]. *Suchasni medychni tekhnolohii*, 3–4, 140–143. [in Ukrainian].
- Kliniko-morfologicheskaya klassifikaciya ostrogo kholecistita* [Clinical and morphological classification of acute

- cholecystitis*] Retrieved from. lektsiopedia.org.
4. Lupal'cov, V. I., Yagnyuk, A. I., & Dekhtyaruk, I. A. (2011). Sovremennye podkhody k taktike vybora operativnogo lecheniya ostrogo kholecistita [Modern approaches to the tactics of choice of surgical treatment of acute cholecystitis]. *Suchasni medychni tekhnologii*, 3–4, 211–213. [in Ukrainian].
  5. Nikonenko, A. S., Golovko, N. G., Grushko, V. A., Klimenko, A. V., Gajdarsi, E. J., Decik, D. A., et al. (2013) Maloinvazivnye tekhnologii v khirurgii zhelchnokamennoj bolezni, oslozhnyonnoj mekhanicheskoy zheltukhoj [Minimally invasive technologies in surgery cholecystitis complicated by obstructive saundice]. *Patolohiia*, 2(28), 4–7. [in Ukrainian].
  6. *Ostryj kholecistit [Acute cholecystitic]* Retrieved from medbe.ru [in Russian].
  7. *Ostryj i khronicheskij kal'kulyoznyj kholecistit [Acute and chronic calculons cholecystitis]* Retrieved from: www.smed.ru [in Russian].
  8. Ramazanova, A. R. (2012) *Kholeciste`ktomiya iz minilaparotomnogo dostupa u bol'nykh starshe 60 let* (Avtoref. dis... kand. med. nauk). [Cholecystectomy from mini laparoscopic access in patients older than 60 years]. (Extended abstract of candidate's thesis). Moscow. [in Russian].
  9. Khatsko, V. V., Shatalov, O. D., Hredzhev, F. A., & Yepifantsev, V. O. (2013). Suchasni napriamky likuvannia hostroho kholet-systytu [Modern treatment of acute cholecystitis directions]. *Shpytalna khirurgiia*, 3, 123–124. [in Ukrainian].
  10. Langenbach, C. (1822) Ein Fall Extipation der Gallenbase urgen Cholilitias. *Hail Beri Klin Woschenschr*, 19, 725–72

**Сведения об авторе:**

Капшитарь А.В., д. мед. н., профессор каф. общей хирургии и ухода за больными, Запорожский государственный медицинский университет, E-mail: alexiy.l@pochta.ru.

**Відомості про автора:**

Капшитар О.В., д. мед. н., професор каф. загальної хірургії та догляду за хворими, Запорізький державний медичний університет, E-mail: alexiy.l@pochta.ru.

**Information about author:**

Капшитар А.В., MD, PhD. DSci, Profwssor of the Department of General Surgery and Patients' Care, Zaporizhzhia State Medical University, E-mail: alexiy.l@pochta.ru.

Надійшла в редакцію 07.04.2015 р.

П. В. Кузик

## Патоморфологічні особливості туберкулом легень (за даними аналізу операційного резекційного матеріалу)

Львівське обласне патологоанатомічне бюро

**Ключові слова:** туберкульоз легень, патогістологія, резекція.

Епідемія туберкульозу в Україні, поширення хіміорезистентних форм захворювання зумовили значні зміни клінічних і патоморфологічних проявів туберкульозу органів дихання. З метою вивчення патоморфологічних особливостей туберкулом дослідили 52 випадки резекційних операцій, що здійснені у 2011–2014 рр. у Львівському регіональному фтизіопульмонологічному центрі. За результатами аналізу встановили локалізацію та розміри туберкулом, анатомічні форми, варіанти перебігу, ступені активності специфічного запалення. Виявили, що 30,8% туберкулом мали прогресуючий перебіг із кавернізацією, високим ступенем активності специфічного запалення, бронхогенною дисемінацією. Патоморфологічні варіанти туберкульозного процесу треба враховувати при визначенні термінів і режимів післяопераційної протитуберкульозної хіміотерапії для запобігання реактивації туберкульозу.

### Патоморфологические особенности туберкулом легких (по данным анализа операционного резекционного материала)

П. В. Кузык

Эпидемия туберкулеза в Украине, распространение химиорезистентных форм заболевания обусловили значительные изменения клинических и патоморфологических проявлений туберкулеза органов дыхания. С целью изучения патоморфологических особенностей туберкулом исследованы 52 случая резекционных операций, проведенных в 2011–2014 гг. во Львовском региональном фтизиопульмонологическом центре. По результатам анализа установлена локализация и размеры туберкулом, анатомические формы, варианты течения, степени активности специфического воспаления. Отмечено, что 30,8% туберкулом имели прогрессирующее течение с кавернизацией, высокой степенью активности специфического воспаления, бронхогенной диссеминацией. Патоморфологические варианты туберкулезного процесса необходимо учитывать при определении сроков и режимов послеоперационной противотуберкулезной химиотерапии для предупреждения реактивации туберкулеза.

**Ключевые слова:** туберкулез легких, гистопатология, резекция.**Патология.** – 2015. – №1 (33). – С. 99–101

### Pathomorphological features of pulmonary tuberculoma (according to the analysis of operational resection material)

P. V. Kuzyk

Tuberculosis epidemic in Ukraine, the growth of chemoresistant forms of the disease caused significant changes in clinical and pathological signs of pulmonary tuberculosis.

**Aim.** In order to study pathomorphological features of tuberculomas 52 cases of resection operations conducted in 2011–2014 in Lviv Regional Center of Phthysiology and Pulmonology were investigated.

**Methods and results.** The analysis showed location and size of tuberculoma, anatomical shape, variants of tuberculoma, degree of activity of specific inflammation were established. It was found that 30,8% of tuberculomas had progressive course with cavernization, high degree of activity of specific inflammation, bronchogenic dissemination.

**Conclusion.** Pathomorphological variants of tuberculous process must be considered when determining the timing and mode of postoperative chemotherapy to prevent reactivation of tuberculosis.

**Key words:** Pulmonary Tuberculosis, Histopathology, Segmentectomy.**Pathologia.** 2015; №1 (33): 99–101

Туберкулома легень – форма вторинного туберкульозу з розвитком інкапсульованого вогнища казеозного некрозу, діаметром більше ніж 1,0 см із малосимптомною клінічною картиною. Найчастіше туберкуломи виникають унаслідок інфільтративного туберкульозу із бронхолобулярного інфільтрату, круглого інфільтрату або інфільтрату Ассмана – Редекера [5]. Рідше їхніми джерелами є вогнищевий, дисемінований туберкульоз, первинний туберкульозний комплекс та інші форми. Умовою розвитку туберкулом є знижена вірулентність і патогенність туберкульозної інфекції та підвищена резистентність організму до збудника

туберкульозу. Туберкулома формується в результаті підвищеної активності фібропластичних процесів і гіперергічної реакції клітинних елементів легеневої тканини в зоні туберкульозного запалення. Навколо казеозно-некротичних мас, що оточені компактним шаром грануляційної тканини, утворюється фіброзний шар. З часом грануляційний шар стає тоншим, а іноді майже повністю зникає. Термін, що необхідний для утворення туберкуломи, зазвичай становить 1–3 роки.

Туберкуломи легень виявляють, як правило, під час профілактичних флюорографічних оглядів. Лікування переважно хірургічне, передбачає виконання резекційних органозберігаючих операцій.

Детальна патоморфологія туберкулом наведена у фундаментальній роботі М.М. Авербаха (1962 р.) [1].

В умовах сучасної епідемії туберкульозу в Україні змінились клінічні та патоморфологічні прояви туберкульозу органів дихання. Відзначають поширення гострих прогресуючих, деструктивних і хіміорезистентних форм захворювання, поєднання специфічного запального процесу з неспецифічними проявами, почастишали випадки розвитку туберкулом, які складно піддаються лікуванню [2,3].

В Україні дослідженням туберкулом нині займаються І.В. Ліскіна та співавт. [3,4]. Актуальними є комплексні патоморфологічні дослідження резектатів легень для морфологічного оцінювання туберкульозного процесу, визначення активності специфічного запалення.

### Мета роботи

Встановити патоморфологічні особливості туберкулом за даними аналізу резектантів легень.

### Матеріали і методи дослідження

Виконали аналіз випадків резекційних операцій із приводу туберкулом і круглих утворень легень, що здійснені у 2011–2014 рр. у 1 і 2 відділеннях торакальної хірургії Львівського регіонального фтизіопульмонологічного центру. За цей період виконали 83 резекційні операції різних форм туберкульозу легень. З приводу туберкулом здійснили 52 (62,7%) операції: резекції сегментів і сегментектомії – 45 (86,5%) випадків; лобектомії – 7 (13,5%). Вивчили історії хвороби всіх пацієнтів, а також результати мікробіологічного, макроскопічного, гістологічного, гістохімічного і гістобактеріоскопічного досліджень операційного матеріалу. Гістологічне дослідження виконали стандартними методами. Для дослідження колагенових волокон гістологічні зрізи фарбували за методом ван Гізона, для виявлення кислотостійких мікобактерій – методами Ціля – Нільсена та Шморля.

У 38 (73,1%) пацієнтів діагноз туберкуломи легень встановили протягом комплексного передопераційного клінічного, рентгенологічного, лабораторного та мікробіологічного дослідження. Перед оперативними втручаннями хворі отримали комплексну протитуберкульозну хіміотерапію за категорією обліку пацієнта, вжиті заходи з санації бронхів і ліквідації неспецифічних запальних явищ, призначена дезінтоксикаційна терапія. У 14 (26,9%) пацієнтів операції здійснили з приводу круглих утворень легень, діагноз туберкуломи легень встановили після гістологічного дослідження операційного матеріалу. Цим хворим не призначали передопераційну протитуберкульозну хіміотерапію.

Серед оперованих пацієнтів 31 (59,6%) чоловік, 21 (40,4%) жінка. Вік хворих – від 18 до 72 років, середній вік –  $45,2 \pm 2,4$  року. Вікові групи хворих (за класифікацією ВООЗ): молодий вік (18–29 років) – 15 (28,9%) випадків, зрілий вік (30–44 роки) – 18 (34,6%), середній вік (45–59 років) – 14 (26,9%), літній (60–74 роки) – 3 (5,8%).

Під час аналізу враховували локалізацію, розміри туберкулом, анатомічні форми відповідно до класифікації М.М. Авербаха [1], типи туберкульозного процесу,

варіанти перебігу туберкулом, ступені активності специфічного запалення [4].

Оцінювання результатів дослідження здійснили статистичними методами.

### Результати та їх обговорення

У результаті дослідження 52 випадків туберкулом одиничні (солітарні) форми виявили у 37 (71,2%) спостереженнях, множинні – у 15 (28,9%). У 29 випадках (55,8%) туберкуломи локалізувались у лівій легені: верхня частка – 18 (62,1%), нижня – 11 (21,2%). У правій легені туберкуломи виявили у 23 (44,2%) випадках: верхня частка – 12 (52,2%), середня – 1 (2,3%), нижня – 8 (15,4%). Одночасна локалізація у верхній і середній частках та верхній і нижній частках – по 1 (2,3%) спостереженню. Найчастіша локалізація туберкулом – другий (20 (38,5%) випадків) і шостий (12 (23,1%) спостережень) сегменти. За розмірами в 11 (21,2%) випадках туберкуломи були дрібними (діаметром до 2,0 см), у 22 (42,3%) – середнього розміру (від 2 до 4 см), у 9 (17,3%) – великими (4,0 см і більше). Вірогідно ( $p < 0,05$ ) переважали одиничні (71,2%) туберкуломи середнього розміру (42,3%) із локалізацією у другому та шостому сегментах легень.

Під час аналізу історій хвороб пацієнтів з'ясували типи туберкульозного процесу: клінічно вперше діагностований туберкульоз (новий випадок) – 24 (46,2%); рецидив туберкульозу – 3 (5,8%) хворих; пацієнти, які раніше отримували лікування від туберкульозу (лікування після перерви, неефективне або невіддале попереднє лікування тощо) – 5 (9,6%); хіміорезистентний туберкульоз – 6 (11,5%) випадків. Під час мікробіологічного дослідження мокротиння в 9 (17,3%) пацієнтів із туберкуломами виявили мікобактерії туберкульозу.

У результаті патоморфологічного дослідження гомогенні туберкуломи з інкапсульованими гомогенними казеозними масами встановили у 35 (67,3%) випадках. Шаруваті туберкуломи виявили у 6 (11,5%) спостереженнях. Для них характерне концентричне розташування казеозно-некротичних мас, що чергуються з пучками фібротизованих колагенових волокон. Конгломератні туберкуломи виявили у 8 (15,4%) пацієнтів. Ці утворення складаються з кількох дрібних казеозних вогнищ, що оточені єдиною фіброзною капсулою. У 2 (3,9%) випадках визначили інфільтративно-пневмонічні туберкуломи – інкапсульовані фокуси туберкульозної пневмонії з дрібними ділянками казеозного некрозу та вираженою продуктивною реакцією. Псевдотуберкулому (блоковану каверну) виявили в 1 (1,9%) випадку.

Отже, серед оперованих пацієнтів із туберкуломами легень вірогідно ( $p < 0,05$ ) переважали гомогенні форми (67,3%).

Прогресуючий перебіг туберкулом легень встановили в 16 (30,8%) пацієнтів. Протягом патоморфологічного дослідження туберкулом, які прогресують, визначили високий ступінь активності специфічного запалення, ділянки деструкції та кавернізацію, виражене перифокальне запалення навколо туберкулом, бронхогенну дисемінацію легеневої тканини, що оточує туберкулому з розвитком ацинозних і лобулярних казеозних вогнищ.

У 2 спостереженнях виявили туберкульозний продуктивний лімфаденіт перибронхіальних лімфатичних вузлів. Для туберкулом, які прогресують, характерний відносно тонкий фіброзний шар капсули з численними туберкульозними гранульомами та дифузна лейкоцитарна інфільтрація казеозно-некротичних мас і грануляційного шару, перифокальні казеозні вогнища. Стабільний перебіг із помірним ступенем активності специфічного запалення спостерігали у 23 (44,2%) випадках. У перифокальних ділянках цих туберкулом виявили фібротизовані туберкульозні гранульоми й вогнища, відсутні інфільтрати та розпад казеозних мас. Лише у 13 (25%) пацієнтів виявили регресію туберкулом із низьким ступенем активності специфічного запалення, перифокальними фіброзними вогнищами. Петрифікацію казеозних мас виявили в 17 (32,7%) випадках туберкулом зі стабільним перебігом і регресією.

Результати дослідження корелюють із відомостями фахової літератури [2–4]. Своєчасне встановлення варіантів перебігу, ступенів активності специфічного запалення та хіміорезистентності є визначальними факторами для успішного лікування туберкульозного процесу в пацієнтів із туберкуломами легень. Як відомо, формування туберкуломи призводить до тривалої

персистенції збудника туберкульозу та його антигенів у зоні ураження [3,5].

Прогресування туберкулом, яке встановили під час патоморфологічного дослідження, обґрунтовує необхідність інтенсивної контрольованої протитуберкульозної хіміотерапії в післяопераційному періоді.

#### Висновки

1. Найчастішою локалізацією туберкулом легень є другий (38,5%) сегмент переважно лівої легені (55,8%). Домінують одиничні (71,2%) туберкуломи середніх розмірів (42,3%).

2. Серед анатомічних форм туберкулом частіше виявляли гомогенні (67,3%) та конгломератні (15,4%).

3. Стабільний перебіг туберкулом із помірним ступенем активності специфічного запалення спостерігали у 44,2% випадків. У 30,8% пацієнтів встановили прогресування захворювання із кавернізацією, високим ступенем активності специфічного запалення, бронхогенною дисемінацією.

4. Патоморфологічні характеристики туберкулом необхідно враховувати під час визначення термінів і режимів післяопераційної протитуберкульозної хіміотерапії для запобігання реактивації туберкульозу.

#### Список літератури

1. Авербах М.М. Туберкулеми легкого / М.М. Авербах. – М.: Гос. изд-во мед. лит., 1962. – 343 с.
2. Винокуров И.И. Особенности морфогенеза туберкулем легких у больных пришлого населения Крайнего Севера / И.И. Винокуров // Якутский медицинский журнал. – 2011. – №1. – С. 66–68.
3. Лискина И.В. Туберкулеми легких: клинико-анатомическая характеристика в период эпидемии / И.В. Лискина // Туберкулез. Легеневі хвороби. ВІІ-інфекція. – 2012. – №1. – С. 38–44.
4. Сучасні гістологічні особливості туберкулом легень при різному ступені активності специфічного запального процесу / І.В. Лискіна С.Д. Кузовкова, Л.М. Загаба, В.Г. Лук'янчук // Сучасні інфекції. – 2010. – №1. – С. 65–72.
5. Холодок О.А. Туберкулема легкого как форма туберкулезного процесса / О.А. Холодок, А.А. Григоренко, М.И. Черемкин // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2014. – Вып. 53. – С. 123–131.

#### References

1. Averbakh, M. M. (1962) *Tuberkulemy legkogo [Lung tuberculomas]*. Moscow: Gosudarstvennoe izdatel'stvo

medicinskoj literatury. [in Russian].

2. Vinokurov, I. I. (2011) Osobnosti morfogeneza tuberkulemy legkikh u bol'nykh prishlogo naseleniya Krajnego Severa [Features of morphogenesis of lung tuberculomas in patients of the Far North] *Yakutskij medicinskij zhurnal*, 1, 66–68. [in Russian].
3. Liskina, I. V. (2012) Tuberkulemy legkikh: kliniko-anatomicheskaya kharakteristika v period epidemii [Lung tuberculomas: clinical and anatomic characteristics in epidemic period] *Tuberkuloz. Lehenevi khvoroby. VII-infektsiia*, 1, 38–44. [in Ukrainian].
4. Liskina, I. V., Kuzovkova, S. D., Zahaba, L. M., & Lukianchuk, V. H. (2010) Suchasni khistolohichni osoblyvosti tuberkulom lehen pry riznomu stupeni aktyvnosti spetsyfichnoho zapalnoho protsesu [Modern histological features of lung tuberculomas at various degrees of activity-specific inflammation] *Suchasni infektsii*, 1, 65–72. [in Ukrainian].
5. Kholodok, O. A., Grigorenko, A. A., Cheremkin, M. I. (2014) Tuberkulema legkogo kak forma tuberkuleznogo processa [Pulmonary tuberculoma as a form of tuberculous process] *Byulleten' fiziologii i patologii dykhaniya*, 53, 123–131. [in Russian].

#### Відомості про автора:

Кузык П.В., к. мед. н., лікар-патологоанатом, Львівське обласне патологоанатомічне бюро, E-mail: kuzyk.med@ukr.net.

#### Сведения об авторе:

Кузык П.В., к. мед. н., врач-патологоанатом, Львовское областное патологоанатомическое бюро, E-mail: kuzyk.med@ukr.net.

#### Information about author:

Kuzyk P.V., MD, PhD, pathoanatomist, Lviv Regional Bureau of Pathology, E-mail: kuzyk.med@ukr.net.

Надійшла в редакцію 17.03.2015 р.

И. В. Лискина<sup>1</sup>, Л. М. Загаба<sup>1</sup>, С. И. Дорофеева<sup>2</sup>

## Инфаркт легкого как хирургическая патология: морфология и дифференциальная диагностика

<sup>1</sup>ГУ «Национальный институт фтизиатрии и пульмонологии им. Ф. Г. Яновского НАМН Украины», г. Киев,<sup>2</sup>ГУ «Национальный институт сердечно-сосудистой хирургии им. Н.М. Амосова НАМН Украины», г. Киев**Ключевые слова:** инфаркт легкого, лабораторные методы и процедуры.

Актуальность работы обусловлена значительными трудностями верификации инфаркта легкого небольших размеров в клинической практике, что приводит к хирургическим вмешательствам по этому поводу. С целью уточнения особенностей течения инфаркта легкого у 4 пациентов с хирургическими вмешательствами по поводу образования в легком и морфологически подтвержденным диагнозом инфаркт легкого изучены анамнестические, клинико-лабораторные данные и выполнено тщательное морфологическое исследование операционного материала. Проанализированы данные современной специализированной литературы. Установлено, что наиболее часто как хирургическую патологию отмечают инфаркт небольших размеров на стадии организации. Определены причины развития, основные гистологические признаки, характеризующие инфаркт легкого, а также дифференциально-диагностические аспекты. Представленный материал свидетельствует, что именно морфологическое исследование является ключевым в постановке диагноза инфаркта легкого в ряде клинических наблюдений.

### Инфаркт легені як хірургічна патологія: морфологія та диференційна діагностика

I. V. Liskina, L. M. Zagaba, S. I. Doropheeva

Актуальність роботи зумовлена значними труднощами верифікації інфаркту легені невеликих розмірів у клінічній практиці, що призводить до хірургічних втручань з цього приводу. З метою уточнення особливостей перебігу інфаркту у 4 пацієнтів із хірургічними втручаннями щодо утворення в легені та морфологічно підтвердженим діагнозом інфаркт легені вивчили анамнестичні, клініко-лабораторні дані та виконали ретельне морфологічне дослідження операційного матеріалу. Проаналізували відомості сучасної фахової літератури. Встановили, що найбільш часто як хірургічну патологію визначають інфаркт невеликих розмірів на стадії організації. Визначили причини розвитку, основні гістологічні ознаки, характерні для інфаркту легені, а також диференційно-діагностичні аспекти. Наведений матеріал свідчить, що саме морфологічне дослідження є ключовим при встановленні діагнозу інфаркту легені у низці клінічних спостережень.

**Ключові слова:** інфаркт легені, лабораторне і клінічне дослідження.**Патологія.** – 2015. – №2 (34). – С. 102–107

### Pulmonary infarct as surgical pathology: morphology and differential diagnosis

I. V. Liskina, L. M. Zagaba, S. I. Doropheeva

The actuality of the work is caused by considerable difficulties of verification pulmonary infarction of small size in clinical practice, which leads to surgical interventions. In order to clarify the characteristics of a pulmonary infarction in 4 patients with surgery through “nodule” in the lung and morphologically confirmed diagnosis of “pulmonary infarction” the medical history, clinical and laboratory data were studied and a thorough morphological study of surgical specimens was performed. The data of modern literature were analyzed. It was found that the most frequent surgical pathology is pulmonary infarction of the small size at the stage of the organization. The cause of development, the main histological features characterizing pulmonary infarction, as well as differential diagnostic considerations were determined. The material presented shows that morphological examination is a key in the diagnosis of pulmonary infarction in a number of clinical observations.

**Key words:** Pulmonary Infarction, Morphology, Clinic-Laboratory Parameters.**Pathologia.** 2015; №2 (34): 102–107

**И**нфаркт (от лат. infarcire – начинять, набивать) – очаг некроза, возникающий в результате острого недостатка кровоснабжения. В зависимости от внешнего вида патологического очага различают три вида инфаркта: белый (ишемический), белый инфаркт с геморрагическим венчиком, красный (геморрагический) инфаркт. В большинстве случаев в легких формируются геморрагические инфаркты [6]. Развитие инфаркта легкого (ИЛ) в значительной степени определяется индивидуальными особенностями ангиоархитектоники легких, наличием анастомозов между системами легочной и бронхиальной артерии. Крайне редко в паренхиме легкого может возникать белый инфаркт, что связано с процессами скле-

розирования и облитерации бронхиальных артерий [1,2].

Как правило, ИЛ возникает на фоне резко выраженного застойного венозного полнокровия паренхимы легкого. В условиях застойного полнокровия и эпизода закрытия просвета ветви легочной артерии тромботическими массами или тромбоемболом в область омертвевшей паренхимы легкого из бронхиальной артерии (редко – из вены) поступает кровь, которая в результате разницы давления разрывает капилляры и изливается в просвет альвеол [10]. Обтурация сосудов сопровождается рефлекторным спазмом в системе легочных артерий, что ведет к легочной гипертензии и перегрузке правых отделов сердца. Происходит нарушение диффузии и арте-

риальная гипоксемия, усугубляющаяся шунтированием недоокисленной крови в легких через артериовенозные и межсистемные анастомозы.

Согласно данным специализированной литературы, чаще ИЛ развивается у больных с предсуществующей сердечной или легочной патологией, то есть в условиях исходно нарушенного кровообращения [4,7]. Предрасполагающими факторами развития патологии являются хирургические вмешательства, послеродовой период у женщин, переломы костей, злокачественные опухоли и длительная иммобилизация пациента. Иными причинами развития ИЛ легкого могут быть тромбозы вен нижних конечностей, флебиты глубоких вен таза, ревматические васкулиты и пр.

Довольно редкая причина формирования инфарктов легких – блокада мелких ветвей легочной артерии в случаях их тромбоза или развитие гранулематоза Вегенера [5,11]. При этом формируется ИЛ небольших размеров, который часто протекает бессимптомно.

В целом клиническая манифестация ИЛ определяется калибром, локализацией и числом обтурированных сосудов, а также состоянием компенсаторных механизмов, исходной патологией легких и сердца. Поэтому в клинике постановка диагноза ИЛ малых размеров достаточно часто является весьма сложной задачей. Для правильной диагностики инфаркта легких имеет значение комплексный анализ клинических данных, результатов рентгенологического исследования, лабораторных показателей. В частности, решающую роль в диагностике тромбоза легочной артерии имеют радиоизотопное сканирование легких и селективная ангиопульмонография [4].

Согласно данным рентгенологического исследования и компьютерной томографии легких, чаще отмечают инфаркты клиновидной формы, реже – округлой и неправильной формы [7,8,11].

При рентгенологическом исследовании чаще всего в легком определяют субплеврально расположенное преимущественно очаговое затемнение паренхимы легкого. Однако этот рентгенологический признак неспецифичен и может отмечаться при многих заболеваниях.

Неспецифические клинические признаки в сочетании с рентгенологическим заключением «образование в легких неясной этиологии» – причина того, что ИЛ небольших размеров, как правило, становится составляющей хирургической патологии легких.

По данным некоторых современных зарубежных публикаций в специализированной литературе, проблема своевременного установления диагноза ИЛ весьма актуальна, особенно в области хирургической патологии легких. К примеру, Parambil J.G. и соавт. [8] описали 43 клинических случая развития ИЛ по операционному материалу за 7-летний период исследования. Авторы установили, что чаще ИЛ возникал у мужчин, средний возраст пациентов составил 55 лет. В 65,0% случаев развитие ИЛ протекало бессимптомно. По данным рентгенологического исследования преобладали солитарные

образования (44,0%), от 1 до 6 см в максимальном размере, но отмечали и множественные образования. В каждом случае детально изучен анамнез заболевания, предшествующие патологические состояния, сопутствующая патология. В результате исследования авторы пришли к выводу: несмотря на то, что тромбоз ветвей легочной артерии является наиболее распространенной причиной развития ИЛ (42,0% случаев), разнообразные не тромботические расстройства (васкулиты, ангиоинвазивные инфекции, синдром диффузного альвеолярного повреждения, прогрессия рака легкого и др.) могут быть причиной развития ИЛ.

Yousem S.A. описал 23 случая развития ИЛ [11]. В этой серии наблюдений количество мужчин и женщин было приблизительно равным (12/11), средний возраст пациентов – 48 лет. По результатам рентгенологического исследования преобладали солитарные или множественные образования в паренхиме легкого (по 41,0% случаев соответственно), в остальных случаях (18,0%) отмечено очаговое уплотнение легочной паренхимы. Только в 26,0% случаев зона инфаркта имела типичную форму треугольника, обращенного основанием к плевре. Авторы отметили, что до эпизода развития ИЛ практически в половине всех наблюдений в истории болезни зафиксирован факт хирургического вмешательства (период до 1 года) по разным причинам.

В классических работах по вопросам патологической анатомии [2,3] описана макроскопическая картина зоны инфаркта как образования конусовидной формы, которое в подавляющем большинстве случаев расположено своей основой к плевральному листку. Максимальный размер образований, как правило, не превышает 5,0–6,0 см. На разрезе зона ИЛ может быть как в форме треугольника, так и неправильной или четырехугольной формы. Последнее касается тех случаев ИЛ, которые расположены в более глубоких отделах легочной паренхимы.

Динамика макроскопических изменений очагового ИЛ представляется следующим образом. Выключенный из кровообращения в течение нескольких часов по системе легочных артерий участок легкого выглядит более полнокровным и отечным по сравнению с окружающей легочной тканью. К концу первых суток после возникновения ИЛ на висцеральной плевре появляется нежный налет фибрина, и плевра слегка выбухает. На вторые сутки паренхима в зоне инфаркта уплотняется и приобретает темно-красный цвет, плевра над зоной инфаркта начинает слегка западать. После 2 недель существования инфаркта начинается его организация. Если при этом происходит присоединение бактериальной инфекции, то отмечают неблагоприятный исход некроза – развивается гнойное расплавление очага омертвения. В случаях «чистых» инфарктов процесс организации начинается с периферических участков образования, который длится несколько месяцев и может приводить к образованию нежного рубца. В некротических массах при сухом некрозе или в очаге омертвения, который подвергся организации, могут откладываться соли кальция.

Тогда развивается обызвествление (петрификация) очага некроза. В некоторых случаях в участке омертвления может формироваться костная ткань, происходит так называемая оссификация пораженной зоны.

Наиболее типичным наблюдением при хирургической резекции является ИЛ на стадии организации. Подробно гистологическая картина инфаркта легкого на стадии его организации с традиционной окраской срезов легочной ткани гематоксилином и эозином описана в работе Yousem S.A. [11]. На малом увеличении только в 6 (26%) из 23 случаев авторы наблюдали характерную треугольную форму инфаркта с признаками хронического фибринозного плеврита в его перифокальной области. В 8 случаях (35%) отмечены т.н. географические области коагуляционного некроза в субплевральной зоне, имеющие серпантинное распределение, с островками сохранной легочной паренхимы, часто окруженной широким валом из некротических эозинофильных масс. В 4 (17%) случаях зона инфаркта имела округлую форму, собственно очаг некроза заключен в толстую фиброзную капсулу. Еще в 5 случаях (22%) инфаркт имел смешанные черты описанных вариантов. Во всех наблюдениях область инфаркта представлена коагуляционным некрозом легочной паренхимы в ассоциации с крупными фокусами геморрагий, на фоне которых хорошо различим интактный «скелет» альвеол, несмотря на субтотальную гибель клеточных компонентов. В большинстве случаев фокусы некроза пересекались междольковыми перегородками (септами). По периферии зоны некроза отмечена выраженная репаративная реакция с развитием грануляционной ткани, которая вовлекала интерстиций и выполняла полости близлежащих альвеол. Типичное наблюдение – валик из гистиоцитов и пенистых макрофагов в виде палисада по краю некротических масс. Кроме того, среди клеточных элементов в грануляционных разрастаниях часто отмечали гемосидерофаги и активированные фибробласты/миофибробласты. Реже обнаруживали гигантские многоядерные клетки среди грануляций, которые содержали кристаллы холестерина и гемосидерин. Перифокальная зона ИЛ демонстрирует яркую псевдогранулематозную реакцию, которая в ряде случаев и служит поводом к постановке ошибочного диагноза гранулематозного заболевания. К периферии от самого патологического очага, как правило, формируется иной тип воспаления, чаще в форме организующейся пневмонии с внутриальвеолярными и интерстициальными миксоидными «пломбами» из молодой рыхлой соединительной ткани с пролиферацией фибробластов и миофибробластов, наличием лимфоплазмочитарных инфильтратов. Реже отмечают многочисленные макрофаги, нагруженные гемосидерином, выпадение пигмента гематоидина и мелкие «свежие» геморрагии (в любом участке патологического очага). Иногда наблюдают дистрофическое обызвествление в зоне некроза или вблизи нее или развитие толстой фиброзной капсулы вокруг фокуса некроза, явления плоскоклеточной метаплазии, реактивной гиперплазии альвеолярных пневмоцитов,

что ошибочно может трактоваться как неопластический процесс.

Кроме того, в зоне коагуляционного некроза могут быть представлены участки базофильной окраски на малом увеличении. При большом увеличении становится очевидным, что эти участки некроза состоят из гранулярного базофильного вещества – обломков ядер некротизированных клеток легочной паренхимы и нейтрофилов (leukocytoclasia), и такие участки могут распространяться до краев некротической области, при этом они ассоциируются с умеренной очаговой нейтрофильной инфильтрацией. Такие «голубые» зоны некробиоза в сочетании с гигантскими клетками и изменениями мелких сосудов могут быть ошибочно трактованы как гранулематоз Вегенера. Важно отметить наличие воспаления в стенках сосудов в большинстве описанных случаев с наличием в субэндотелии и медиі пульмональных артерий лимфоцитов, плазматических клеток и редких нейтрофилов в различном количестве. Однако очевидные признаки некроза сосудистых стенок или фрагментации их эластических волокон не обнаружены. При интенсивном воспалении сосудистых стенок может возникать вопрос о диагнозе васкулита. Принципиальный момент в постановке диагноза ИЛ – обнаружение тромбозов пульмонального сосуда вблизи очага некроза. Как правило, тромбоз располагается внутри артерии мышечного типа, реже в вене [11].

В близлежащей легочной паренхиме можно также обнаружить морфологические признаки респираторного бронхоолита с эмфизематозными изменениями, фолликулярные бронхоэктазы.

Таким образом, данные специализированной литературы демонстрируют разнообразие причин развития ИЛ, вариантов его формирования и исхода. Многообразие гистологических проявлений ИЛ в зависимости от стадии развития объясняет сложность его морфологической диагностики. Совокупность этих фактов диктует необходимость более тщательного изучения и освещения данной патологии.

#### **Цель работы**

Уточнить особенности течения инфаркта легкого на основании анамнестических, клинико-лабораторных данных и морфологического изучения операционного материала от 4 пациентов с хирургическими вмешательствами по поводу образования в легком.

#### *Собственные наблюдения*

В 2009–2014 гг. среди всех прооперированных пациентов с предварительным клиническим диагнозом образование в легком неясной этиологии было всего 4 случая инфаркта легкого с его гистологической верификацией.

Проанализированы данные истории болезни каждого случая, клинико-лабораторные показатели и рентгенологическое заключение для уточнения клинических особенностей развития ИЛ. Некоторые клинические характеристики этих случаев представлены в *таблице 1*.

В 3 из 4 случаев ИЛ установлен у мужчин. По данным специализированной литературы, ИЛ чаще диагностиру-



Клиническая характеристика пациентов с инфарктом легкого

№ наблюдения	Возраст/пол	Курение	Клинические симптомы					
			приступы одышки	кашель	эпизоды кровохарканья	общая слабость	потливость	повышение температуры тела
1	52/муж	в прошлом	–	+	–	–	–	–
2	19/муж	постоянно	–	–	–	–	–	+
3	58/муж	постоянно	+	+	+	+	–	+
4	53/жен	не курит	–	–	–	–	+	+

Примечания: (+) – наличие симптома; (–) – отсутствие симптома.

ют у лиц старше 40 лет, однако исключением являются больные ревматизмом или пациенты с аллергическими заболеваниями легких [2,8], что совпало с одним нашим наблюдением (№2). На момент оперативного вмешательства 2 пациента курили по 1 пачке сигарет в день.

ИЛ достаточно часто протекает бессимптомно. В наших наблюдениях пациенты предъявляли жалобы, связанные с уже имеющейся сопутствующей патологией и/или наличием инфекционного заболевания непосредственно перед оперативным вмешательством. В 3 случаях отмечено повышение температуры тела, 2 пациентов жаловались на сухой кашель, у 1 больного были периодические эпизоды кровохарканья.

В случае №1 у больного до оперативного вмешательства установлен диагноз тромбоз вен нижних конечностей. Пациент отмечал отечность, ощущение тяжести в конечностях.

В таблице 2 представлены рентгенологические признаки, установленные у пациентов, а также тип выполненных операций.

Согласно результатам рентгенологического исследования, во всех случаях очаговое уплотнение или инфильтрат располагались субплеврально в различных сегментах (долях) правого легкого. Только в 1 случае рентгенологически заподозрен диагноз туберкулемы легкого, в других наблюдениях описанная рентгенологическая картина в значительной степени соответствовала новообразованию, что совпадает с результатами других авторов [7,11].

В каждом из наблюдений метод выбора оперативного вмешательства был разным, что определялось, главным образом, расположением образования (инфильтрата/полости распада) в легком.

В таблице 3 представлена фоновая и сопутствующая патологии, установленные в группе наблюдений.

Из 4 наблюдений тромбоз вен нижних конечностей – наиболее распространенный фактор риска развития ИЛ – диагностирован в 1 случае. У 1 пациента в анамнезе была бронхиальная астма. У 3 пациентов отмечена сопутствующая патология: пневмония бактериальной этиологии, единичная туберкулема после лечения очагового туберкулеза, атеросклероз с ишемической болезнью сердца в сочетании с хронической церебральной недостаточностью. Наши данные согласуются с выводами других авторов о наиболее частых предпосылках возникновения ИЛ [7–9].

При макроскопическом исследовании удаленных фрагментов легочной ткани в 3 случаях макроскопически зона инфаркта имела преимущественно неправильную форму; только в 1 случае (наблюдение №2) эта зона имела типичную треугольную форму, обращенную основанием к висцеральной плевре.

При микроскопическом исследовании во всех случаях в паренхиме легких определен субплеврально расположенный фокус коагуляционного некроза, окруженный разрастаниями грануляционной ткани различной степени зрелости и выраженности (рис. 1). В 3 случаях (наблюдения №1–3) ИЛ был на стадии организации,

Таблица 2

Рентгенологические особенности и характер оперативного лечения

№ наблюдения	Одиночный узел/инфильтрат	Солитарная полость распада	Наличие плеврального выпота	Признаки эмфиземы и пневмосклероза легочной ткани	Субплевральная локализация инфаркта	Расположение очага в легких	Тип оперативного вмешательства
1	+	–	–	–	+	средняя доля правого легкого	типичная резекция средней доли правого легкого
2	+	+	–	–	+	верхняя доля правого легкого	краевая резекция верхней доли правого легкого
3	–	–	+	+	+	нижняя доля правого легкого	видеоторакоскопия с биопсией S10 правого легкого
4	–	+	–	–	+	нижняя доля правого легкого	резекция нижней доли правого легкого

Примечания: (+) – наличие симптома; (–) – отсутствие симптома.

## Фоновая и сопутствующая патология у пациентов с инфарктом легкого

№ наблюдения	Фоновые заболевания	Сопутствующая патология
1	тромбофлебит сосудов нижних конечностей	–
2	–	пневмония бактериальной природы
3	персистирующая бронхиальная астма, эмфизема легких	атеросклероз с ишемической болезнью сердца, хроническая церебральная недостаточность
4	–	солитарная туберкулома S6 правого легкого

только в 1 случае (№4) отмечены морфологические признаки перехода острого периода инфаркта к началу организации.

В случаях, которые соответствовали ИЛ на стадии организации, наблюдали некоторые морфологические изменения. В наблюдении №1 среди некротизированной ткани достаточно четко определялся «каркас» из стенок альвеол; наблюдали врастание в зону некроза мелкого участка грануляционной ткани. В случаях №1,2 по периферии зоны некроза определен клеточный вал из гистиоцитов; снаружы от этого клеточного вала обнаружены разрастания грануляционной ткани различных размеров. В наблюдении №1 зона инфаркта была частично инкапсулирована (разрастания грубоволокнистой соединительной ткани), а частично окружена разрастаниями зрелой неспецифической грануляционной ткани. В грануляционной ткани (случаи №2,3) установлены скопления сидерофагов, лимфоидных клеток и гистиоцитов. В наблюдениях №1,2 среди разрастаний грануляционной ткани были очаговые массивные скопления кристаллов гематоидина (рис. 2) и мелких капель жира, среди которых располагались немногочисленные многоядерные гигантские макрофаги по типу «инородного тела». Во всех 3 наблюдениях в сохранных альвеолярных пространствах в периферической зоне к инфаркту наблюдали скопления гемосидерофагов, представленные в разном количестве. В случае №2 вблизи зоны инфаркта определены единичные неспецифические гранулемы, сформированные преимущественно из гистиоцитов, фибробластов и многоядерных гигантских клеток. Вне грануляционной ткани в этом же случае наблюдали единичные миофибробластические очаги.

Во всех наших наблюдениях ИЛ среди относительно сохранной структуры легочной ткани наблюдали явления очагового пневмофиброза различной степени выраженности. В наблюдениях №1,2 в этих же участках легких

отмечены немногочисленные мелкие лимфоидноклеточные скопления, а в наблюдении №3 – мелкие очаги кровоизлияний в просветах альвеол.

В случаях №1,3 в перифокальной зоне инфаркта паренхима легкого находилась в состоянии дистелектаза, наблюдали морфологические признаки организующейся интерстициальной пневмонии. В наблюдении №1 отмечено сочетание очагового пневмофиброза и эмфизематозных явлений в легочной паренхиме.

Во всех 4 случаях ИЛ имели место явления склероза стенок сосудов микроциркуляторного русла различной степени выраженности. В случае №3 в прилежащей к зоне инфаркта легочной ткани отмечен резко выраженный склероз и гиалиноз сосудов микроциркуляторного русла без очевидных признаков воспаления. В наблюдении №1 обнаружен длительно существующий тромб в сосуде вблизи очага инфаркта (артерия мышечного типа), с частичной реканализацией, который, вероятнее всего, и был причиной развития инфаркта легкого (рис. 3). Такие морфологические изменения типичны для диагноза инфаркт легкого и вполне соответствуют морфологическим изменениям, которые описаны зарубежными коллегами [11].

## Выводы

Инфаркт легкого небольших размеров – относительно редкий вид патологии легких. Учитывая особенности рентгенологической картины, отсутствие специфической клинической симптоматики, ИЛ часто служит поводом к хирургическому вмешательству.

На основании результатов собственных наблюдений и опыта зарубежных коллег можно констатировать: инфаркт легкого, особенно небольших размеров, остается преимущественно хирургической патологией, и только тщательное гистологическое исследование позволяет правильно установить окончательный диагноз.

## Список литературы

- Абрикосов А.И. Частная патологическая анатомия. Вып. III. Органы дыхания / А.И. Абрикосов. – Москва, 1947. – 567 с.  
 Есипова И.К. Легкое в патологии. Часть 2 / под ред. И.К. Есиповой. – Издательство «Наука», Новосибирск. – 1975. – 247 с.  
 Калитиевский П.Ф. Макроскопическая дифференциальная диагностика патологических процессов / П.Ф. Калитиевский – Москва «Медицина», 1987. – 400 с.  
 Пульмонология: национальное руководство / под ред. А.Г. Чучалина. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 960 с.  
 Сахарчук И.И. Воспалительные заболевания легких и плевры: дифференциальная диагностика и лечение / И.И. Сахарчук, Р.И. Ильницкий. – Киев.: ООО «Книга плюс», 2006. – 296 с.  
 Струков А.И. Патологічна анатомія: підручник / А.И. Струков,

В.В. Серов. – Харків. – 2004. – 864 с., іл.

Bray T.J. Multimodality imaging of pulmonary infarction / T.J. Bray, K.H. Mortensen, D. Gopalan // Eur. J. Radiol. – 2014. – Vol. 83(12). – P. 2240–54. – Режим доступа: doi: 10.1016/j.ejrad.2014.07.016.

Causes and presenting features of pulmonary infarctions in 43 cases identified by surgical lung biopsy / J.G. Parambil, C.D. Savci, H.D. Tazelaar, J.H. Ryu // Chest. – 2005. – № 127. – P. 1178–1183.

Clinical-pathological correlation of pulmonary thromboembolism in cardiovascular surgery / T.T. Lisvet [et al.] // CorSalud. – 2014. – Vol. 6(3). – P. 217–222.

Tsao M.S. Pathogenesis of pulmonary infarction / M.S. Tsao, D. Schraufnagel, N.S. Wang // Am. J. Med. – 1982. – Vol. 72, № 4. – P. 599–606.

Yousem S.A. The surgical pathology of pulmonary infarcts: diagnostic confusion with granulomatous disease, vasculitis, and neoplasia / S.A. Yousem // *Modern Pathology*. – 2009. – Vol. 22. – P. 679–685.

#### References

Abrikosov, A.I. (1947). *Chastnaya patologicheskaya anatomiya. V. III*. [Special pathological anatomy]. Organyi dyihaniya. Moscow. [in Russian].

Esipova, I.K. (1975). *Legkoe v patologii. Chast 2* [Lung in pathology]. I.K. Esipova (Ed). Novosibirsk: Nauka. [in Russian].

Kalitievskiy, P.F. (1987). *Makroskopicheskaya differentsialnaya diagnostika patologicheskikh protsessov*. [Macroscopic differential diagnosis of pathological processes]. Moscow: Meditsina. [in Russian].

*Pulmonologiya: natsionalnoe rukovodstvo* (2009). [Pulmonology: national leadership]. A.G. Chuchalin (Ed). Moscow: GEOTAR-Media. [in Russian].

Saharchuk, I.I. & Ilnitskiy, R.I. (2006). *Vospalitelnyie zabolovaniya legkih i plevryi: differentsialnaya diagnostika i lechenie*

[Inflammatory diseases of the lung and pleura: differential diagnosis and treatment]. Kiev: Kniga plyus. [in Ukrainian].

Strukov, A.I. & Serov, V.V. (2004). *Patologichna anatomiya: pidruchnik* [Pathological anatomy: a textbook]. Harkiv. [in Ukrainian].

Bray, T.J., Mortensen, K.H. & Gopalan, D. (2014). Multimodal imaging of pulmonary infarction. *European Journal of Radiology*, 83(12), 2240–54. doi: 10.1016/j.ejrad.2014.07.016.

Parambil, J.G., Savci, C.D., Tazelaar, H.D. & Ryu, J.H. (2005). Causes and presenting features of pulmonary infarctions in 43 cases identified by surgical lung biopsy. *Chest*, 127, 1178–1183.

Lisvet, T.T., Ileana, P.R., Rudy, H.O., et al. (2014). Clinical-pathological correlation of pulmonary thromboembolism in cardiovascular surgery. *Cuban Society of Cardiology*, 6(3), 217–222.

Tsao, M.S., Schraufnagel, D. & Wang, N.S. (1982). Pathogenesis of pulmonary infarction. *American Journal of Medicine*, 72(4), 599–606.

Yousem, S.A. (2009). The surgical pathology of pulmonary infarcts: diagnostic confusion with granulomatous disease, vasculitis, and neoplasia. *Modern Pathology*, 22, 679–685.

#### Сведения об авторах:

Лискина И.В., д. мед. н., зав. лабораторией патоморфологии, ГУ «Национальный институт фтизиатрии и пульмонологии им. Ф.Г. Яновского НАМН Украины», E-mail: liskina@ifp.kiev.ua.

Загаба Л.М., к. мед. н., научный сотрудник лаборатории патоморфологии, ГУ «Национальный институт фтизиатрии и пульмонологии им. Ф.Г. Яновского НАМН Украины».

Дорофеева С.И., врач-патологоанатом патологоанатомического отделения, ГУ «Национальный институт сердечно-сосудистой хирургии им. Н.М. Амосова НАМН Украины».

#### Відомості про авторів:

Ліскіна І.В., д. мед. н., зав. лабораторії патоморфології, ДУ «Національний інститут фтизіатрії та пульмонології ім. Ф.Г. Яновського НАМН України», E-mail: liskina@ifp.kiev.ua.

Загаба Л.М., к. мед. н., науковий співробітник лабораторії патоморфології, ДУ «Національний інститут фтизіатрії та пульмонології ім. Ф.Г. Яновського НАМН України».

Дорофєєва С.І., лікар-патологоанатом патологоанатомічного відділення, ДУ «Національний інститут серцево-судинної хірургії ім. М.М. Амосова НАМН України».

#### Information about authors:

Liskina I.V., M.D., Ph.D., Professor, the Head of the laboratory of pathomorphology SO «National institute of phthysiology and pulmonology named after F.G. Yanovsky National academy of medical sciences of Ukraine», E-mail: liskina@ifp.kiev.ua.

Zagaba L.M., M.D., Ph.D., researcher of the laboratory of pathomorphology SO «National institute of phthysiology and pulmonology named after F.G. Yanovsky National academy of medical sciences of Ukraine».

Doropheeva S.I., M.D., a doctor of Department of Pathology SO «National institute of cardiovascular surgery named after N.M. Amosova National academy of medical sciences of Ukraine».

Надійшла в редакцію 03.03.2015 р.

## ПАМ'ЯТІ ПРОФЕСОРА СТУПІНОЇ ОЛЕКСАНДРИ СЕМЕНІВНИ



**М**инув рік як не стало вченого, вчителя з великої літери, чудової людини, яка поєднувала в собі усі найкращі риси, що притаманні патологам.

Ступіна Олександра Семенівна у 1946 р. з відзнакою закінчила інститут (у 1944 р. реєвакуйований у Харків). Того самого року стала співробітником кафедри патологічної анатомії, якою керував проф. Г.Л. Дерман. Від 1947 до 1951 р. навчалась в аспірантурі кафедри патологічної анатомії, й у 1951 р. захистила кандидатську дисертацію на тему «Патоморфологія и гистохимия околощитовидной железы при различных заболеваниях». Цього ж року її призначено на посаду асистента, а 1953 р. – доцента кафедри патологічної анатомії. У 1964 р. О.С. Ступіна захистила докторську дисертацію на тему «Патоморфологические изменения в сердце при хронических неспецифических воспалительных заболеваниях лёгких». Упродовж багатьох років була вченим секретарем Вченої ради з захисту дисертацій при Харківському медичному інституті. У 1964 р. обійняла посаду завідувача лабораторії патоморфології Інституту охорони материнства та дитинства (м. Київ).

Під час роботи в лабораторії патоморфології ДУ «ПАГ НАМН України» віддавала улюбленій справі усі знання, прагнення вченого, свою любов, глибоку порядність і безкомпромісність. Ці якості прищепила й своїм учням. Зокрема, О.С. Ступіна запропонувала Т.Д. Задорожній тему кандидатської дисертації, науковим керівником якої вона була, а згодом стала консультантом докторської дисертації, брала участь у багатьох обговореннях і наукових напрямках.

У червні 1965 р. обрана за конкурсом на посаду завідувача лабораторії морфології та цитології Інституту геронтології АМН СРСР; з 1989 р. – науковий консультант. У лабораторії виконувалися також морфологічні розділи дисертацій співробітників інших відділів та інститутів: патофізіологи – Г.М. Бутенко, О.А. Гурська, В.А. Міхньов, імунолог – Л.Ф. Андріанова, фізіологи – Ю.Б. Рушкевич, клініцисти – Н.К. Фуркало, Є.В. Орлова та ін. Дослідження були б неможливі без допомоги фахівців з електронної мікроскопії – В.В. Гаврилей і Ю.Б. Шарабури.

Тематика досліджень лабораторії стосувалася вивчення структурних змін серцево-судинної та центральної нервової системи при старінні та в умовах підвищеного функціонального навантаження й експериментальної патології. Разом з академіком М.М. Горевим вивчали вікові патоморфологічні, гистохімічні та ультраструктурні особливості експериментального атеросклерозу. Наступні дослідження були присвячені послідовності та темпу розвитку вікових ультраструктурних змін клітин із різною мітогічною активністю, а також вивченню ультраструктурних особливостей гістогематичного бар'єра міокарда, мозку, печінки і деяких ендокринних залоз. Особливу увагу приділено розбудові енергозабезпечувальних структур, змінам білоксинтезуючого апарату клітини у процесі старіння, в умовах підвищеного функціонального навантаження органів, а також при експериментальній патології у тварин. Важливим стало виявлення при цьому адаптаційних процесів у клітинах і гістогематичному бар'єрі. Запропоновано методику оцінювання виразності якісних і кількісних змін у клітинах. Здійснювали дослідження з вивчення впливу геропротекторів на структуру й ультраструктуру клітин експериментальних тварин різного віку (у комплексі з лабораторією фармакології – з професором Л.П. Курраш).

О.С. Ступіна була членом правління Всеоюзного товариства патологів. Під її керівництвом виконано 30 кандидатських і 7 докторських дисертацій. Професор О.С. Ступіна – автор більш ніж 200 наукових праць і 5 монографій. Основні публікації: «Експериментальный атеросклероз и возраст» (в соавт. с Н.Н. Горевым и др.; 1972); «Структурные изменения клеток и тканей в процессе старения организма» (в кн. «Руководство по геронтологии», 1978); «Старение клетки» (в кн. «Биология старения. Руководство по физиологии», 1982); «Функциональная морфология эндокринных желез при атеросклерозе и старении» (в соавт. с О.К. Хмельницким, 1989); «Старение мозга» (в соавт. с В.В. Фролькисом и др., 1991); «Изменения митохондрий при старении», Вестник АМН СССР, 1984, №3); «Enterosorption in prolonging of life of the old animals» (Experimental Gerontology, 1984, №4); «Ультраструктурные проявления реакции гистогематических барьеров у старых животных на острую гипоксию» (Вестник АМН СССР, 1990, №1); «Критерии морфофункциональной оценки выраженности деструктивных и адаптационных изменений в тканях при старении» (в кн. «Геронтология и гериатрия. Ежегодник», 1991).

З 1989 р. лабораторією керувала учениця професора О.С. Ступіної – Т.Ю. Квітницька-Рижова.

*Світла пам'ять про Олександру Семенівну Ступіну, її професійну, педагогічну, наукову, громадсько-організаторську діяльність зберігається в серцях вдячних учнів.*

*Зав. лабораторії патоморфології д. мед. н., професор Т.Д. Задорожна, співробітники лабораторії ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології НАМН України», зав. лабораторії морфології Інституту геронтології НАМН України д. мед. н., професор Т.Ю. Квітницька-Рижова.*