

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ КАРТИНА СПАЕЧНОГО ПРОЦЕССА В БРЮШНОЙ ПОЛОСТИ У ДЕТЕЙ ПРИ НЕДИФФЕРЕНЦИРОВАННОЙ ДИСПЛАЗИИ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

© Алина Николаевна Григорова¹, Алла Григорьевна Сирак¹, Сергей Викторович Минаев¹, Сергей Иванович Тимофеев², Елена Ивановна Пашнева¹, Евгения Ивановна Пискарева¹, Мария Олеговна Диденко¹

¹Ставропольский государственный медицинский университет. 355000, Ставрополь, Мира ул., 310

²Магаданская областная детская больница. 685030, Магадан, Кольцевая ул., 24

Контактная информация: Алина Николаевна Григорова — ассистент кафедры гистологии.
E-mail: alina.mashchenko@mail.ru

РЕЗЮМЕ: Цель. Исследование иммуногистохимической (ИГХ) картины спаек брюшной полости при спаечной кишечной непроходимости (СКН) у детей с ассоциированной недифференцированной дисплазией соединительной ткани (НДСТ). **Материалы и методы.** Исследован биоматериал 16 детей, оперированных по поводу СКН. Мальчиков было 10, девочек — 6. Возраст — $8,6 \pm 1,4$ лет. Больные были разделены на 2 группы: 1 группа (9 пациентов без НДСТ) и 2 группа (7 детей с ассоциированной НДСТ). Материал для исследования был взят при проведении лапароскопического или традиционного адгезиолизиса. ИГХ проводили на серийных парафиновых срезах толщиной 5 мкм, помещенных на адгезивные стекла, покрытые полилизинном (Menzel-Glaser, Германия). Использовались моноклональные антитела к коллагену I, II, III и IV типа (Dako, Denmark), к ламинину, к факторам ангиогенеза (VEGF) и фактору роста фибробластов (bFGF). Определяли количество окрашенных в коричневый цвет коллагеновых волокон в 10 полях зрения на площади $502,08 \text{ мкм}^2$ (увеличение $\times 40$; $\times 100$; $\times 400$ микроскопа Olympus CX-41). **Результаты.** ИГХ в 1 группе выявило преобладание коллагена I типа с меньшим количеством коллагена II и III типа. Во 2 группе отмечали отсутствие в спайках коллагена I типа. При этом коллаген II типа располагается хаотично, а коллаген III типа присутствует в составе фибрилл. Соотношение коллагена I типа ко II составляет 1,4:3,9. Коллаген IV типа отсутствовал. В 1 группе наблюдается выраженное накопление bFGF в эндотелиоцитах и ламинина в базальной мембране, по сравнению с накоплением VEGF. **Выводы.** Таким образом, различное содержание коллагена в спайках у детей со СКН и у детей с НДСТ и без нее диктует необходимость дальнейшего изучения данного показателя в качестве фактора прогноза развития спаечной болезни брюшной полости.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: иммуногистохимия, брюшная полость, спайки, дети, недифференцированная дисплазия соединительной ткани.

IMMUNOHISTOCHEMICAL PICTURE OF ADHESIONS IN THE ABDOMINAL CAVITY IN CHILDREN WITH NON — DIFFERENTIATED CONNECTIVE TISSUE DYSPLASIA

© Alina N. Grigorova¹, Alla G. Sirak¹, Sergey V. Minaev¹, Sergey I. Timofeev², Elena I. Pashneva¹, Evgenia I. Piskareva¹, Maria O. Didenko¹

¹Stavropol State Medical University. 355000, Stavropol, Mira str., 310

²Magadan Regional Children's Hospital. 685030, Magadan, Koltsovaya str., 24

Contact Information: Alina N. Grigorova — assistant of the Department of Histology. E-mail: alina.mashchenko@mail.ru

ABSTRACT: A study of the immunohistochemical (IHC) picture of adhesions of the abdominal cavity with adhesive intestinal obstruction (SKN) in children with associated undifferentiated connective tissue dysplasia (NDST). **Materials and methods.** We studied the biomaterial of 16 children operated on for SKN. There were 10 boys, 6 girls. Age — 8.6 ± 1.4 years. Patients are divided into 2 groups: 1 group (9 patients without NDCT) and 2 group (7 children with associated NDCT). Material for the study was taken during laparoscopic or traditional adhesiolysis. IHC was carried out on serial paraffin sections with a thickness of 5 μm , placed on adhesive glasses coated with polylysine (Menzel-Glaser, Germany). Primary antibodies are monoclonal antibodies to type I, II, III and IV collagen (Dako, Denmark), to Laminin, to angiogenesis factors (VEGF) and fibroblast growth factor (bFGF). The amount of brown-colored collagen fibers was determined in 10 fields of view over an area of 502.08 μm^2 (magnification $\times 40$; $\times 100$; $\times 400$ of the Olympus CX-41 microscope). **Results.** IHC in group 1 revealed a predominance of type I collagen with less collagen type II and type III. In group 2, the absence of type I collagen in commissures was noted. In this case, type II collagen is randomly located, and type III collagen is present in fibrils. The ratio of collagen type I to co II is 1.4: 3.9. Type IV collagen was absent. In group 1, there is a pronounced accumulation of bFGF in endotheliocytes and Laminin in the basement membrane, rather than VEGF. **Conclusions:** Thus, the different collagen content in adhesions in children with SKN, in children with and without NDCT, necessitates further study of this indicator as a predictor of the development of adhesions of the abdominal cavity.

KEY WORDS: immunohistochemistry, abdominal cavity, adhesions, children, Non-differentiated connective tissue dysplasia

ВВЕДЕНИЕ

Одна из особенностей ответной реакции поврежденной ткани брюшной полости — запуск сложного многоступенчатого процесса, который ведет за собой регенеративный ответ соединительной ткани [5, 6]. Данный фактор играет несомненную роль в формировании спаечного процесса в брюшной полости. Патогенетические основы образования спаек — многофакторный и недостаточно изученный процесс, в котором ведущую роль отводят выпадению фибрина [4]. Последний приводит к развитию внутрибрюшных сращений, что способствует развитию осложнений, которые занимают ведущее место в структуре причин заболеваемости и смертности в абдоминальной хирургии [8, 13]. Основываясь на значимости коллагеновых волокон и факторов ангиогенеза в возникновении интраабдоминального спаечного процесса, стоит вопрос об их дальнейшем изучении у детей. Особая роль в абдоминальной практике детского хирурга отводится лечению детей с недифференцированной дисплазией соединительной ткани [11].

ЦЕЛЬ

Исследование иммуногистохимической (ИГХ) картины спаек брюшной полости при спаечной кишечной непроходимости (СКН) у детей с ассоциированной недифференцированной дисплазией соединительной ткани (НДСТ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На базе ГБУЗ СК «Краевая детская клиническая больница» г. Ставрополя, в период 2010–2019 гг., оперировано 16 детей по поводу СКН, развившейся через 3–16 месяцев после различных оперативных вмешательств на брюшной полости. Мальчиков — 10, девочек — 6. Средний возраст $8,6 \pm 1,4$ лет. Больные разделены на 2 группы: 1 группа (9 пациентов без НДСТ) и 2 группа (7 детей с ассоциированной НДСТ). С целью диагностики НДСТ были использованы скрининговые карты, выявление у одного пациента 6 и более стигм дисэмбриогенеза считали подтверждением синдрома дисплазии соединительной ткани. Биоматериал для исследования был взят при проведении лапароскопического или традиционного адгезиолиза. Полученный материал был изучен на базе гистохимической лаборатории кафедры гистологии Ставропольского государственного медицинского университета. Иммуногистохимическое исследование проводили на серийных парафиновых срезах толщиной 5 мкм, помещенных на адгезивные стекла, покрытые полилизинном (Menzel-Glaser, Германия). Для освобождения антигенов после фиксации формалином использовали тепловую демаскировку антигенов в микроволновой печи Samsung при мощности 800 Вт в течение 10 минут в цитратном буфере при pH 6,0. Использовались первичные моноклональные антитела к коллагену I,

II, III и IV типа (Dako Denmark). Определяли количество окрашенных в коричневый цвет коллагеновых волокон в 10 полях зрения на площади 502,08 мкм² (увеличение $\times 40$; $\times 100$; $\times 400$ микроскопа Olympus CX-41). Использовали моноклональные антитела к белку базальной мембраны ламинину (Laminin $\gamma 1$, R&D Systems, Inc.), к факторам ангиогенеза: васкулоэндотелиальному фактору (VEGF, R&D Systems, Inc.) и к основному фактору роста 18 фибробластов (bFGF, R&D Systems, Inc.). Контрольная реакция проводилась без использования первичных специфических антител (негативный контроль).

Статистический анализ осуществлялся методами вариационной статистики с использованием χ^2 -теста, критерия Вилкоксона и критерия Стьюдента. Чтобы определить тесноту (силу) и направление корреляционной связи между двумя признаками или двумя профилями признаков использовали метод ранговой корреляции Спирмена (rs). Полученные результаты были интерпретированы: $rs < 0,35$ — слабая корреляция, $0,35 < rs < 0,7$ — умеренная корреляция и $rs > 0,7$ — сильная корреляция. О достоверности различий величин исследуемых показателей судили при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам ИГХ в 1 группе биоматериал, взятый из соединительнотканых спаек, соединяющих петли кишечника, наблюдалось преобладание коллагена I типа (рис. 1), меньшее количество коллагена II и III типа. Ярко выражена пролиферация синтетически активных фибробластов (рис. 2, А, Б). Соотношение коллагена I типа ко II составляет 6,3:2,7. Коллаген IV типа обнаруживается в базальных мембранах эндотелия сосудов (рис. 3). Спайки, соединяющие брюшину сальника с париетальной брюшиной, состоят из пучков коллагеновых волокон I и III типа. Иммуногистохимический анализ выявил отсутствие в данных спайках коллагена II типа, при этом соотношение коллагена I и II типов — 3,5:2,9 (рис. 4). Коллаген IV типа определяется в меньшем количестве. Наблюдается выраженное накопление bFGF в эндотелиоцитах и ламинина в базальной мембране, по сравнению с накоплением VEGF ($rs = 0,430$, $p < 0,001$).

Во 2 группе, у детей с ассоциированной НДСТ, спаечный материал, соединяющий петли кишечника, показал в данных спайках отсутствие (56%) или хаотичные фрагменты (44%) коллагена I типа (рис. 5), коллаген

II типа располагается беспорядочно, коллаген III типа присутствует в составе фибрилл. Соотношение коллагена I типа ко II составляет

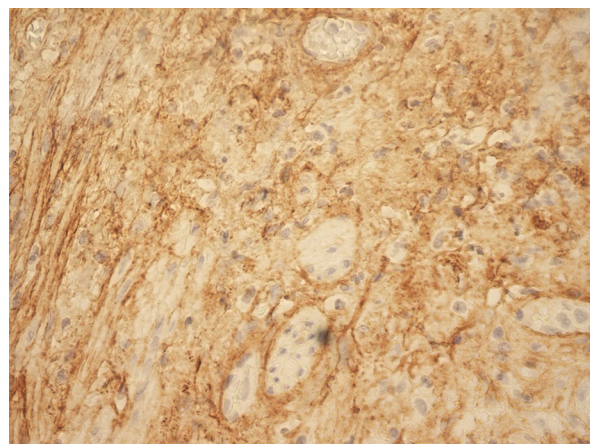


Рис. 1. Микропрепарат биоптата соединительной ткани при спаечном процессе брюшной полости в основной группе. ИГХ-исследование показателя экспрессии моноклональных кроличьих антител к коллагену I типа (COL1A1). Докрашивание гематоксилином. Ок. 10, Об. 400

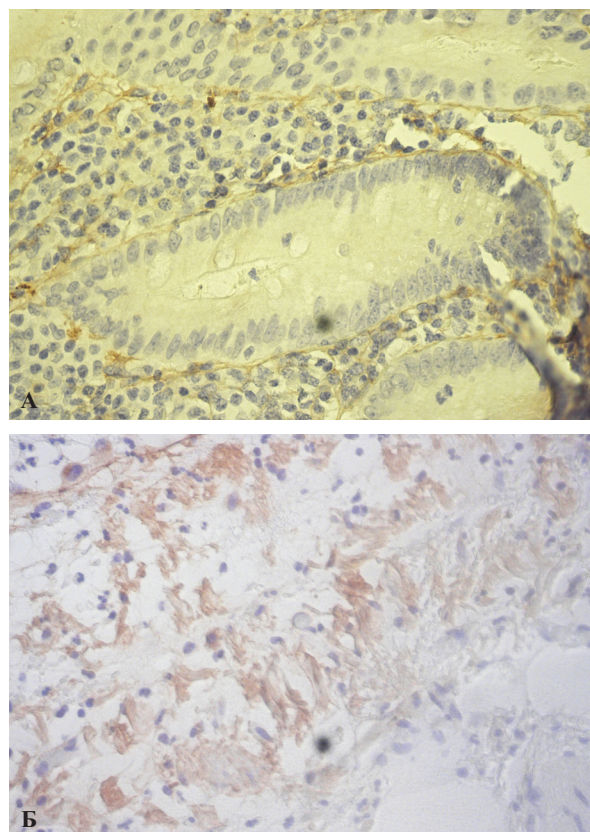


Рис. 2. Микропрепарат биоптата соединительной ткани при спаечном процессе брюшной полости в основной группе. Активно выраженная экспрессия фибробластов. Докрашивание гематоксилином. Ок. 10, Об. 400

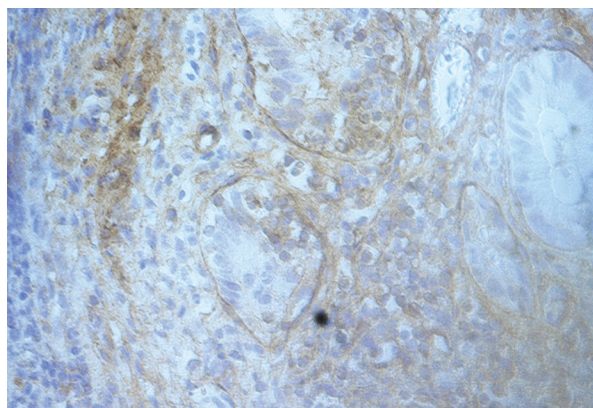


Рис. 3. Микропрепарат биоптата соединительной ткани при спаечном процессе брюшной полости в основной группе. ИГХ-исследование показателя экспрессии моноклональных кроличьих антител к коллагену IV типа. Докрашивание гематоксилином. Ок. 10, Об. 400

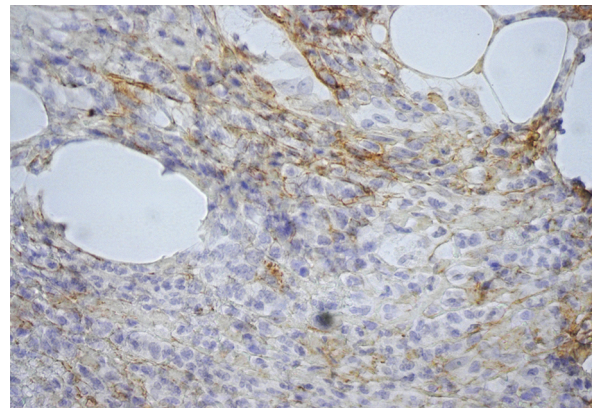


Рис. 5. Микропрепарат биоптата соединительной ткани при спаечном процессе брюшной полости контрольной группы. ИГХ-исследование показателя экспрессии моноклональных кроличьих антител к коллагену I типа (COL1A1). Докрашивание гематоксилином. Ок. 10, Об. 400

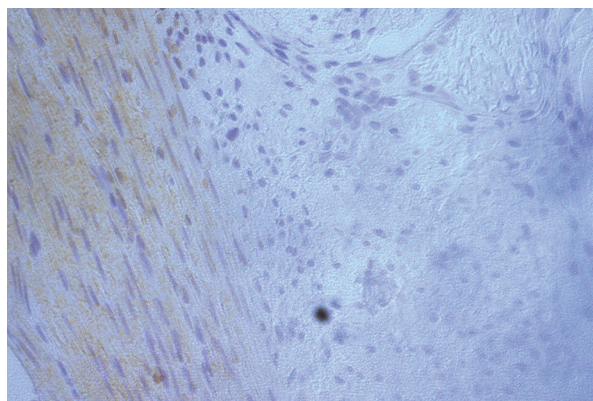


Рис. 4. Микропрепарат биоптата соединительной ткани при спаечном процессе брюшной полости в основной группе. ИГХ-исследование показателя соотношения экспрессии моноклональных кроличьих антител к коллагену I и II типа. Докрашивание гематоксилином. Ок. 10, Об. 400

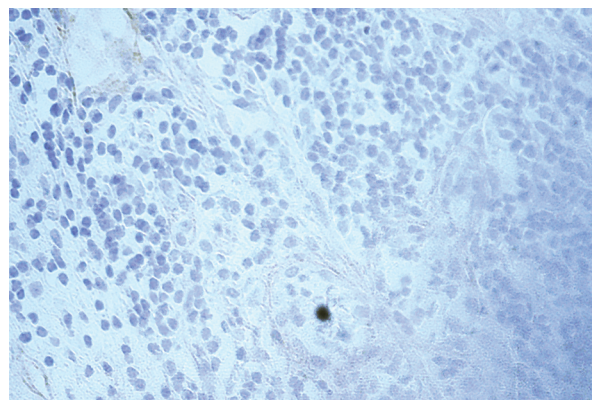


Рис. 6. Микропрепарат биоптата соединительной ткани при спаечном процессе брюшной полости в контрольной группе. ИГХ-исследование показателя экспрессии моноклональных кроличьих антител к коллагену IV типа. Докрашивание гематоксилином. Ок. 10, Об. 400

1,4:3,9. Коллаген IV типа отсутствовал (рис. 6). Наблюдается менее выраженное накопление bFGF и ламинина в спайках между петлями кишечника, при этом обнаружена высокая сконцентрированность VEGF в спайках между сальником и брюшиной. Количество дифференцированного спаечного процесса было достоверно больше в 1 группе, нежели во 2 ($\chi^2=21,3$; $df=2$, $p=0,001$).

В этапности развития спаечного процесса в брюшной полости можно выделить ряд причин как со стороны брюшной полости, так и от внеорганных изменений [4]. Выделено 3 группы причин, влияющих на развитие интраабдоминального фиброза: 1) состояние и патоморфологические процессы, происходящие в области оперируемых органов (воспа-

ление тканей, технические погрешности в виде чрезмерной мобилизации стенки органа и грубого наложения швов, внутривисцеральное и общее нарушение кровообращения, повышение внутрикишечного давления, гипопроteinемия, локальное инфицирование и др.); 2) неблагоприятные интраоперационные и послеоперационные факторы; 3) анатомо-физиологические особенности ребенка. Для профилактики образования спаек в брюшной полости всем детям в нашей работе применяли комплекс мероприятий, включавший в себя: минимальную травматизацию брюшины во время операции; ушивание десерозированных участков кишки; профилактику фибринообразования (интраоперационный лаваж), воспалительной реакции брюшины (антибиотики,

противовоспалительные средства) и тканевой ишемии (новокаиновая блокада, инфузия дезагрегантов и др.) [1, 12, 15].

Проведенное нами клинико-гистологическое исследование и результаты ряда авторов [2, 7, 9] показали, что образование спаек в брюшной полости связано с факторами ангиогенеза и процессом образования фибробластов. Для этого необходимо изучение внеклеточного матрикса (ламинин) и васкулоэндотелиального фактора и фактора роста фибробласта. Одновременное повышение концентрации данных факторов в раннем послеоперационном периоде предотвращает развитие спаечного процесса в брюшной полости у детей. Но у детей с НДСТ вышеуказанные факторы не могут сформировать точной прогностической картины с возможным развитием спаечного процесса [3, 6, 14], что также подтверждается неуточненными данными о количественной и качественной картинах типа коллагеновых волокон при спаечном процессе брюшной полости у детей с НДСТ [10].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, содержание различных типов коллагеновых волокон в спайках при СКН у детей с НДСТ и без нее диктует необходимость дальнейшего изучения данного показателя в качестве фактора прогноза развития спаек брюшной полости. Все это делает необходимым дальнейшее изучения роли НДСТ в возникновении и развитии различных атипичных патологических реакций в брюшной полости, что необходимо для своевременного прогнозирования возможных осложнений в абдоминальной хирургии у детей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абушкин И.А., Белякова А.В., Галиулин М.Я. Диагностика и лечение спаечной странгуляционной кишечной непроходимости у детей. *Детская хирургия*. 2020; 24(S1): 9.
2. Клеменов А.В. Недифференцированные дисплазии соединительной ткани. М.; 2005: 136.
3. Лазаренко В.А., Конопля А.И., Бежин А.И., Липатов В.А., Гомон М.С., Локтионов А.Л., Жуковский В.А. Морфологические изменения в брюшной полости при использовании иммуномодуляторов для профилактики послеоперационного спаечного процесса. *Вестник новых медицинских технологий*. 2010; 17(3): 9–14.
4. Минаев С.В., Доронин В.Ф., Обедин А.Н., Тимофеев С.В. Течение спаечного процесса брюшной

полости в детском возрасте. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2009; 1: 17–20.

5. Минаев С.В., Обозин В.С., Пустошкина Л.Т., Барнаш Г.М., Тулюбаев И.Н. Новые аспекты в патогенезе спаечного процесса брюшной полости. *Вестник хирургии им. И.И. Грекова*. 2009; 168(1): 45–9.
6. Bayhan Z., Zeren S., Kocak F.E., Kocak C., Akcilar R., Kargi E., Tiryaki C., Yaylak F., Akcilar A. Antiadhesive and anti-inflammatory effects of pirfenidone in postoperative intra-abdominal adhesion in an experimental rat model. *J. Surg. Res.* 2016; 201: 348–55.
7. Christodoulidis G., Tsiloni I., Spyridakis M.-E., Kiroopoulos T., Oikonomidi S., Koukoulis G., Tepetes K. Matrix Metaloproteinase-2 and -9 Serum Levels as Potential Markers of Intraperitoneal Adhesions. *J. Investig. Surg.* 2013; 26: 134–40.
8. Junga A., Pilmane M., Abola Z., Volrats O. The Distribution of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Human Beta-Defensin-2 (HBD-2), and Hepatocyte Growth Factor (HGF) in Intra-Abdominal Adhesions in Children under One Year of Age. *Sci. World J.* 2018; 2018: 5953095.
9. Molinas C.R., Campo R., Dewerchin M. et al. Role of vascular endothelial growth factor and placental growth factor in basal adhesion formation and in carbon dioxide pneumoperitoneum-enhanced adhesion formation after laparoscopic surgery in transgenic mice. *Fertil Steril.* 2003; 80(2): 803–11.
10. Oettgen P. Transcriptional regulation of vascular development. *Circ. Res.* 2001; 89(4): 380–8.
11. Pugh C.W., Ratcliffe P.J. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat. Med.* 2003; 9(10): 677–84.
12. Sun H.-J., Cai W.-W., Gong L.-L., Wang X., Zhu X.-X., Wan M.-Y., Wang P.-Y., Qiu L.-Y. FGF-2-mediated FGFR1 signaling in human microvascular endothelial cells is activated by vaccarin to promote angiogenesis. *Biomed. Pharmacother.* 2017; 95: 144–52.
13. Vallée A., LeCarpentier Y., Guillevin R., Vallée J.-N. Interactions between TGF- β 1, canonical WNT/ β -catenin pathway and PPAR γ in radiation-induced fibrosis. *Oncotarget.* 2017; 8: 90579–90604.
14. Wagoner L.E., Merrill W., Jacobs J. et al Angiogenesis Protein Therapy with Human Fibroblast Growth Factor (FGF-1): Results of a Phase I Open Label. *Circulation.* 2007; 116(6): 443–6.
15. Wang S., Gao X., Shen G., Wang W., Li J., Zhao J., Wei Y.-Q., Edwards C.K. Interleukin-10 deficiency impairs regulatory T cell-derived neuropilin-1 functions and promotes Th1 and Th17 immunity. *Sci. Rep.* 2016; 6: 24249.

REFERENCES

1. Abushkin I.A., Belyakova A.V., Galiulin M.Ya. Diagnostika i lecheniye spayeychnoy strangulyatsionnoy

- kishechnoy neprokhodimosti u detey. [Diagnostics and treatment of adhesive strangulated intestinal obstruction in children]. *Detskaya khirurgiya*. 2020; 24(S1): 9. (In Russian).
2. Klemenov A.V. Nedifferentsirovannyye displazii soyedinitel'noy tkani. [Undifferentiated connective tissue dysplasia]. Moscow; 2005: 136. (In Russian).
 3. Lazarenko V.A., Konoplya A.I., Bezhin A.I., Lipatov V.A., Gomon M.S., Loktionov A.L., Zhukovskiy V.A. Morfologicheskiye izmeneniya v bryushnoy polosti pri ispol'zovanii immunomodulyatorov dlya profilaktiki posleoperatsionnogo spayehnogo protsessa. [Morphological changes in the abdominal cavity when using immunomodulators for the prevention of postoperative adhesions]. *Vestnik novykh meditsinskiy tekhnologiy*. 2010; 17(3): 9–14. (In Russian).
 4. Minayev S.V., Doronin V.F., Obedin A.N., Timofeyev S.V. Tsechniye spayehnogo protsessa bryushnoy polosti v detskom vozraste. [The course of the adhesions of the abdominal cavity in childhood]. *Meditsinskiy vestnik Severnogo Kavkaza*. 2009; 1: 17–20. (In Russian).
 5. Minayev S.V., Obozin V.S., Pustoshkina L.T., Barnash G.M., Tulyubayev I.N. Novyye aspekty v patogeneze spayehnogo protsess bryushnoy polosti. [New aspects in the pathogenesis of the abdominal adhesive process]. *Vestnik khirurgii im. I.I. Grekova*. 2009; 168(1): 45–9. (In Russian).
 6. Bayhan Z., Zeren S., Kocak F.E., Kocak C., Akcilar R., Kargi E., Tiryaki C., Yaylak F., Akcilar A. Antiadhesive and anti-inflammatory effects of pirfenidone in postoperative intra-abdominal adhesion in an experimental rat model. *J. Surg. Res*. 2016; 201: 348–55.
 7. Christodoulidis G., Tsilioni I., Spyridakis M.-E., Kiropoulos T., Oikonomidi S., Koukoulis G., Tepetes K. Matrix Metalloproteinase-2 and -9 Serum Levels as Potential Markers of Intraperitoneal Adhesions. *J. Investig. Surg*. 2013; 26: 134–40.
 8. Junga A., Pilmane M., Abola Z., Volrats O. The Distribution of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Human Beta-Defensin-2 (HBD-2), and Hepatocyte Growth Factor (HGF) in Intra-Abdominal Adhesions in Children under One Year of Age. *Sci. World J*. 2018; 2018: 5953095.
 9. Molinas C.R., Campo R., Dewerchin M. et al. Role of vascular endothelial growth factor and placental growth factor in basal adhesion formation and in carbon dioxide pneumoperitoneum-enhanced adhesion formation after laparoscopic surgery in transgenic mice. *Fertil Steril*. 2003; 80(2): 803–11.
 10. Oettgen P. Transcriptional regulation of vascular development. *Circ. Res*. 2001; 89(4): 380–8.
 11. Pugh C.W., Ratcliffe P.J. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat. Med*. 2003; 9(10): 677–84.
 12. Sun H.-J., Cai W.-W., Gong L.-L., Wang X., Zhu X.-X., Wan M.-Y., Wang P.-Y., Qiu L.-Y. FGF-2-mediated FGFR1 signaling in human microvascular endothelial cells is activated by vaccarin to promote angiogenesis. *Biomed. Pharmacother*. 2017; 95: 144–52.
 13. Vallée A., LeCarpentier Y., Guillevin R., Vallée J.-N. Interactions between TGF- β 1, canonical WNT/ β -catenin pathway and PPAR γ in radiation-induced fibrosis. *Oncotarget*. 2017; 8: 90579–90604.
 14. Wagoner L.E., Merrill W., Jacobs J. et al. Angiogenesis Protein Therapy with Human Fibroblast Growth Factor (FGF-1): Results of a Phase I Open Label. *Circulation*. 2007; 116(6): 443–6.
 15. Wang S., Gao X., Shen G., Wang W., Li J., Zhao J., Wei Y.-Q., Edwards C.K. Interleukin-10 deficiency impairs regulatory T cell-derived neuropilin-1 functions and promotes Th1 and Th17 immunity. *Sci. Rep*. 2016; 6: 24249.