

**Я.Ю. Войтів, О.Ю. Усенко, О.О. Дядик\****Кафедри хірургії та трансплантології (зав. – проф. О.Ю. Усенко), \*патологічної та топографічної анатомії (зав. – проф. О.О. Дядик) Національної медичної академії післядипломної освіти імені П.Л. Шупика, м. Київ*

## ГІСТОЛОГІЧНИЙ ТА ІМУНОГІСТОХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ ЗМІН СПОЛУЧНОЇ ТКАНИНИ У ХВОРИХ ІЗ ЗОВНІШНІМИ КИШКОВИМИ НОРИЦЯМИ

**Резюме.** Обстежено 43 хворих із зовнішніми тонко і товстокишковими норицями та патологією сполучної тканини, які лікувались у ДУ «НІХТ ім. О.О. Шалімова» впродовж 2017-2020 рр. При комплексному дослідженні фрагментів тканин тонкої та товстої кишок виявлено схожі морфологічні зміни у групах з фенотипічними ознаками недиференційованої дисплазії сполучної тканини та із зовнішніми кишковими норицями. При імуногістохімічному дослідженні тканин з моноклональними антитілами до  $\alpha$ -SMA в обох групах виявлено нерівномірну, вогнищеву експресію в клітинах гладком'язового диференціювання та у фібробластах; з моноклональними антитілами до Collagen IV відмічається помірна позитивна експресія в базальній мембрані судин, в гладком'язових клітинах м'язового шару стінки судин, в ділянках сполучної тканини, що є ознаками патологічного ремоделювання сполучної тканини.

**Ключові слова:** недиференційована дисплазія сполучної тканини, тонко - товстокишкові нориці, гістологічні, гістохімічні маркери.

Зовнішні кишкові нориці є тяжким ускладненням в абдомінальній хірургії, яке становить реальну загрозу для життя пацієнта. До цього часу у хірургічній спільноті немає єдиної точки зору на причини розвитку кишкових нориць, лікувальної тактики при розвитку цих ускладнень.

Частота виникнення кишкових нориць становить 1-2 % від усіх абдомінальних операцій, але вони створюють багато проблем як з хірургічної точки зору, так і з точки зору лікування самого хворого [1]. В англійській літературі найчастіше трапляється проста та зручна класифікація, що базується на анатомічних, функціональних (дебіт в мл/добу) та етіологічних характеристиках кишкової нориці [2]. Існує класифікація, що базується на етіології нориці: тип I (стравохідний, гастродуоденальний), тип II (тонка кишка), тип III (товста кишка) та IV тип (зовнішня нориця незалежно від походження) [3].

Післяопераційні кишкові нориці становлять 75-85 % усіх кишкових нориць. Післяопераційне ускладнення у вигляді нориці часто розвивається після онкологічних операцій, операцій з приводу запальних захворювань кишок та гострої кишкової непрохідності [4].

Відповідно даним літератури тонкокишкові нориці відкриваються у вільну черевну порожнину у 29-32 %, через порожнину гнійника відкриваються в 24,3 % випадків, через евентеровану

рану – 9,3 % [5]. Летальність при розвитку кишкових нориць в ранньому післяопераційному періоді становить 16,5-57,5 %, а в гострому періоді (несформовані кишкові нориці) – 20,0-80,0 %, при високих тонкокишкових норицях – 82-90 % [6]. Основні причини смерті: прогресуючий перитоніт, сепсис, інтоксикація, синдром мальнутриції, водноелектролітні порушення, печінково-ниркова недостатність, кишкова недостатність [7]. Незважаючи на вдосконалення харчової та метаболічної підтримки, антимікробної терапії, поліпшенню догляду за ранами та вдосконаленні операційної техніки рівень летальності при цьому ускладненні залишається вкрай високим [3, 5].

У літературі трапляються поодинокі публікації про роль недиференційованої дисплазії сполучної тканини (НДСТ) у розвитку кишкових нориць [6, 7]. Відмічається, що тяжкий ступінь дисплазії сполучної тканини у хворих з кишковими норицями, є несприятливою прогностичною ознакою та у 1,6 рази збільшує частоту летальних випадків [8].

**Мета дослідження:** покращення результатів лікування хворих з тонко-, товстокишковими норицями шляхом визначення ролі недиференційованої дисплазії сполучної тканини в розвитку цих ускладнень.

**Матеріал і методи.** Об'єктом проспективного дослідження був 21 хворий з зовнішніми ки-

шковими норицями які лікувались у ДУ «НІХТ імені О.О. Шалімова» впродовж 2017-2020 рр. та 20 практично здорових людей які співставні за віком і статтю з досліджуваними.

Об'єктом дослідження були 43 пацієнти, що лікувались у ДУ «НІХТ імені О.О. Шалімова», з яких 21 хворих з зовнішніми кишковими норицями, 22 пацієнти з фенотипічними ознаками НДСТ. Для оцінки стану метаболізму сполучної тканини вивчали вміст у сироватці крові вільного оксипроліну та рівень глікозаміногліканів у сечі. НДСТ діагностували за напрацьованою методикою (патент України на корисну модель № 120158 UA). Ступінь дисплазії оцінювали за оригінальною клінічною скринінг-шкалою, напрацьованою на основі таблиці критеріїв вираженості дисплазії сполучної тканини за Т.Ю. Смольною (2003).

Морфологічні дослідження були проведені на кафедрі патологічної та топографічної анатомії НМАПО імені П.Л. Шупика.

Для оцінки особливостей та властивостей сполучної тканини було проведено гістологічне та імуногістохімічне дослідження (ІГХД) тканини тонкої та товстої кишок. Гістологічні зрізи товщиною 3-4 мкм забарвлювали гематоксиліном і еозином, пікрофуксином за ван Гізеном, за Массоном (Masson Trichrome Kit 87019), проводилась PAS-реакція [9].

ІГХД проводили для оцінки особливостей та властивостей сполучної тканини. Використано систему детекції Master Polymer Plus Detection System (Peroxidase), хромоген ДАБ (Masterdiagnostica (Гранادا, Іспанія)). ІГХД проведено з наступними маркерами (Thermo Scientific, США): моноклональними антитілами (МАТ) до Collagen IV (clone CIV22),  $\alpha$ -гладком'язового актину  $\alpha$ -SMA (clone CIV22). Оцінка експресії маркерів проводилась згідно наявності характерного коричневого забарвлення клітин різного ступені інтенсивності згідно візуально-аналогової шкали. Інтенсивність експресія оцінювали від 0 – «відсутня» до +++ – «виражена» [10].

Мікроскопічне дослідження та фотоархівування проводили із використанням світлооптичних мікроскопів «ZEISS» (Німеччина) з системою обробки даних «Axio Imager. A2» при збільшенні об'єктивів 5x, 10x, 20x, 40x, біноккулярної насадку 1,5 та окулярів 10 з камерою ERe 5s, «Carl Zeiss» Primo Star з камерою AxioCam105 color.

Основну частину статистичного аналізу було проведено з використанням програми «Statistica 7.0» (SPSS) та Excel 2000. Номінальні дані подано у вигляді кількісних та відсоткових значень.

**Результати досліджень та їх обговорення.** У

досліджуваній групі пацієнтів з зовнішніми кишковими норицями, переважну більшість становили хворі після ургентних операцій з приводу гострої кишкової непрохідності, поширеного перитоніту, деструктивного панкреатиту, гострого деструктивного апендициту. У 47,6 % (10 з 21) випадків причиною розвитку нориць була неспроможність швів анастомозів. У 2 випадках нориці виникли у пацієнтів з гігантськими рецидивними вентральними грижами (защемлення кишки в грижевому мішку – 1, фіксація кишки до сітчастого трансплантату – 1); 2 товстокишкові нориці у хворих з деструктивним панкреатитом (пролежень від дренажа – 1, парапанкреатичний абсцес – 1); пошкодження дванадцятипалої кишки (ДПК) під час правобічної нефректомії – 1, перфорація дивертикула товстої кишки – 2, перфорація сліпої та висхідної ободової кишок внаслідок абсцесів очеревинної порожнини – 2. У решті випадків (2) переконливих причин не було виявлено.

Критерієм виключення з досліджуваної групи були нориці у пацієнтів з неспецифічним виразковим колітом, хворобою Крона та кишкові нориці, що виникли на тлі променевої терапії.

В обстежених нами пацієнтів з зовнішніми кишковими норицями органів травлення ознаки НДСТ виявлені у 15 (71,4 %) пацієнтів. Часто виявлялися наступні фенотипічні синдроми НДСТ: вісцеральний (84,2 %), судинний (73,7 %), аритмічний (63,1 %) синдроми.

Дослідження фенотипічних ознак НДСТ в групі хворих з зовнішніми кишковими норицями показало, що у 3 пацієнтів (15,8 %) – легкий ступінь НДСТ, у 7 (36,8 %) – середній та, відповідно, у 6 пацієнтів (31,6 %) виявлено тяжкий ступінь НДСТ. У 3 хворих (15,8 %) ознаки патології сполучної тканини не виявлені (діаграма 1).

Рівень сироваткового оксипроліну у групі пацієнтів без фенотипічних ознак дисплазії склав  $37,4 \pm 4,7$  мкмоль/л, що на 76 % перевищує показники контрольної групи ( $21,2 \pm 0,8$  мкмоль/л). Такі зміни, очевидно, зумовлені підвищеною протеолітичною активністю у пацієнтів з кишковими норицями та неспроможністю швів анастомозів. Це підтверджує дані ряду авторів, що при кишкових норицях розвивається виражене і стійке неузгодження в системі протеїнази – інгібітори протеїнази плазми крові. Саме гіперактивація протеолітичних систем організму на тлі редукції інгібіторного потенціалу розцінюється як одна з ключових патогенетичних ланок ендогенної інтоксикації.

При вивченні динаміки змін показників сироваткового оксипроліну встановлено, що зрос-

тання колагенолітичної активності рівня глікозаміногліканів та вільного оксипроліну мали прямий кореляційний зв'язок із ступенем тяжкості НДСТ. Так, при легкому ступені НДСТ рівень сироваткового оксипроліну становив  $(48,2 \pm 2,6)$  мкмоль/л, середньому ступені  $(75,1 \pm 3,6)$  мкмоль/л та важкому ступені  $(114,3 \pm 3,9)$  мкмоль/л, що у 5,5 разів перевищувало показники контрольної групи та у 3 рази показники пацієнтів з кишковими норицями без клінічних ознак дисплазії.

При комплексному гістологічному та імуногістохімічному дослідженні фрагментів тканин тонкої та товстої кишок виявлено схожі морфологічні зміни у групах з фенотипічними ознаками недиференційованої дисплазії сполучної тканини та з зовнішніми кишковими норицями.

У тканинах стінки тонкої кишки (рис. 1, 2) відмічались схожі гістологічні зміни: нерівномірно виражене розростання сполучної тканини, дифузна та/або вогнищева лімфогістіоплазмодитарна інфільтрація, зони ангіоматозу, повнокрів'я судин та гіаліноз їх стінок.

При забарвленні за Ван Гізоном візуалізуються пучки фіброзної тканини (червоного кольору), що дифузно проростають між м'язовими волокнами, на окремих ділянках фіброзна тканина виповнює більшість площі поля зору (рис. 3).

При проведенні ІГХД з МАТ до  $\alpha$ -SMA відмічалась незначна, переважно вогнищева експресія в стінках судин, в зоні власної пластинки, ділянках склерозу з інтенсивністю переважно до 1 балу у ділянках тканини з кишковими норицями (рис. 4).

При проведенні ІГХД з МАТ до Collagen IV тканин у фрагментах стінки тонкої кишки (рис. 5)

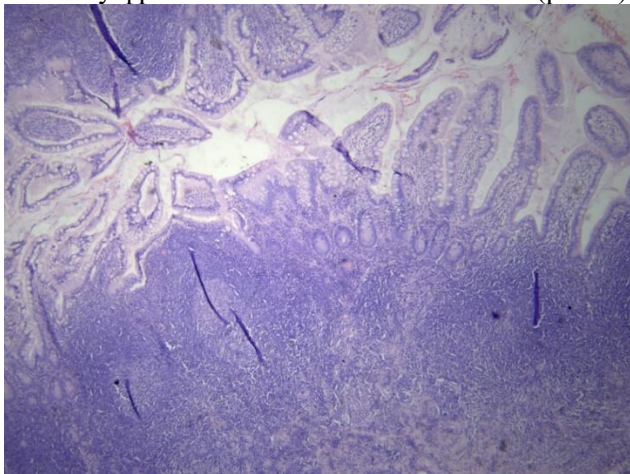


Рис. 1. Фрагмент тканини стінки тонкої кишки з вираженою лімфогістіоплазмодитарною інфільтрацією, розростанням сполучної тканини в зоні власної пластинки. Забарвлення гематоксилін-еозином. Збільшення  $\times 40$

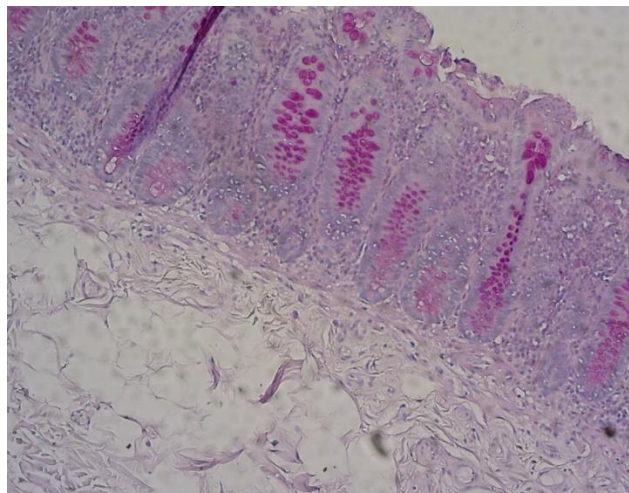


Рис. 2. Фрагмент тканини стінки тонкої кишки, нерівномірне збереження секретії. Забарвлення PAS. Збільшення  $\times 100$

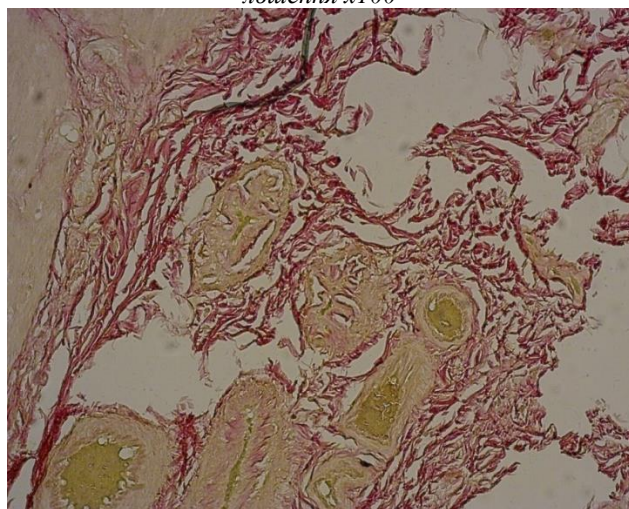


Рис. 3. Фрагмент тканини стінки товстої кишки з пучками фіброзної тканини, що дифузно проростають між м'язовими волокнами, периваскулярно. Забарвлення за Ван Гізоном. Збільшення  $\times 100$

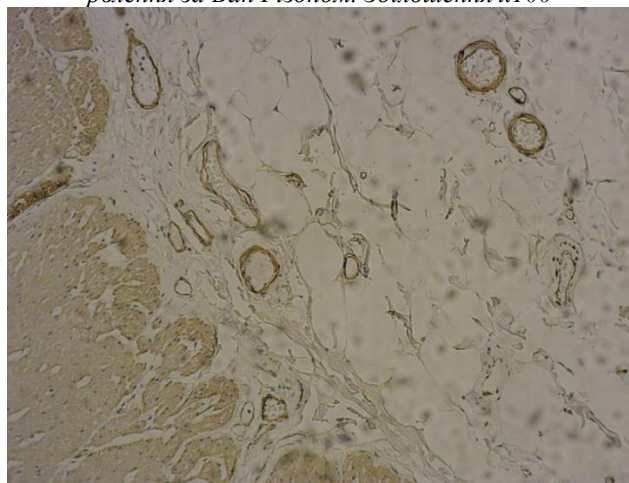


Рис. 4. Тканина стінки товстої кишки з вогнищевою експресією з інтенсивністю до 1 балу. ІГХД з МАТ до  $\alpha$ -SMA. Збільшення  $\times 100$

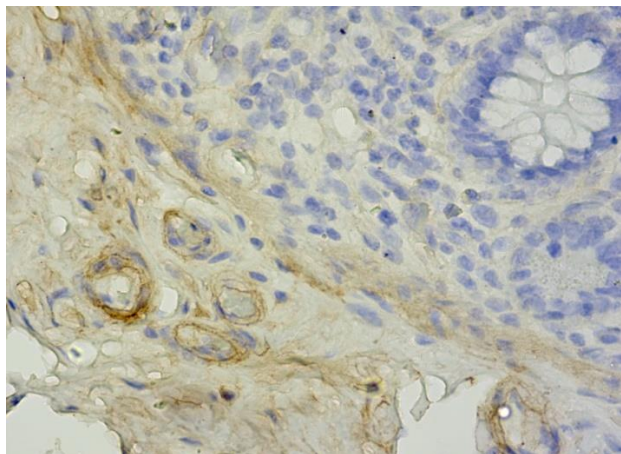


Рис. 5. Нерівномірна слабка позитивна експресія у власній пластинці, в зоні розростання сполучної тканини, в стінці окремих судин вогнищева помірна експресія у фрагменті стінки тонкої кишки. ІГХД з МАТ до Collagen IV. Збільшення  $\times 100$

відмічається переважно слабо виражена позитивна експресія в базальній мембрані судин, в гладком'язових клітинах м'язового шару стінки судин, у ділянках сполучної тканини з інтенсивністю забарвлення до +, вогнищево до ++.

Отже, нами виявлено схожі морфологічні зміни тонкої, товстої кишок у групах з фенотипічними ознаками недиференційованої дисплазії сполучної тканини та з зовнішніми кишковими норицями.

При гістологічному дослідженні відмічаються: виражене розростання сполучної тканини, дифузна або вогнищева лімфогістіоплазмодитарна інфільтрація, ангіоматоз, повнокрів'я судин, гіаліноз їх стінок; візуалізуються пучки фіброзної тканини, що дифузно проростають між м'язовими волокнами, на окремих ділянках фіброзна тка-

нина вповнює більшість площі поля зору.

При ІГХД з МАТ до  $\alpha$ -SMA в обох групах виявлена нерівномірна, вогнищева експресія в клітинах гладком'язового диференціювання та фібробластах; з МАТ до Collagen IV в фрагментах тонкої, товстої кишок відмічається нерівномірна слабка та/або помірна позитивна експресія в базальній мембрані судин, в гладком'язових клітинах м'язового шару стінки судин, в ділянках сполучної тканини.

На наш погляд, фокус майбутніх досліджень патогенетичних факторів абдомінальних післяопераційних ускладнень повинен зміститися на більш клітинний та молекулярний рівень. Отже, краще розуміння механізмів розвитку кишкових нориць буде сприяти напрацюванню нових діагностичних, прогностичних та лікувальних методик.

**Висновки:** 1. Схожі гістологічні, гістохімічні, імуногістохімічні ознаки у групах з фенотипічними ознаками недиференційованої дисплазії сполучної тканини та з зовнішніми кишковими норицями підтверджують роль патології сполучної тканини в розвитку післяопераційних ускладнень, а саме зовнішніх кишкових нориць. 2. Наявність дисплазії сполучної тканини у хворих з зовнішніми кишковими норицями є обтяжуючим коморбідним фактором, що необхідно враховувати при виборі адекватної хірургічної тактики та комплексного патогенетично обґрунтованого лікування.

**Перспективи подальших досліджень.** Планується подальше вивчення клініко-морфологічних маркерів, що визначають основні ланки патогенезу абдомінальних післяопераційних ускладнень.

#### Список використаної літератури

1. Schechter WP, Hirshberg A, Chang DS, et al. Enteric fistulas: principles of management. *J Am Coll Surg.* 2009;209:484-91.
2. Teixeira PGR, Inaba K, Dubose J, Salim A, Brown C, Rhee P, et al. Enterocutaneous fistula complicating trauma laparotomy. A major resource burden. *Am Surg.* 2009;75(1):30-2.
3. Schein M, Decker GA. Postoperative external alimentary tract fistulas. *Am J Surg.* 1991;161(4):435-8.
4. Rene G, John A. Surgical treatment – evidence-based and problem-oriented. München, Germany: W. Zuckschwerdt Verlag Munchen. 2001;843.
5. Whelan J, Ivatury R. Enterocutaneous fistulas: an overview. *Eur J Trauma Emerg Surg.* 2011;37(3):251-8. doi: 10.1007/s00068-011-0097-2.
6. Усенко ОЮ, Войтів Я.Ю. Частота та критерії діагностики недиференційованої дисплазії сполучної тканини у хворих хірургічного стаціонару. *Клінічна хірургія.* 2017;10: 5-7. doi: <https://doi.org/10.26779/2522-1396.2017.10.05>.
7. Van Haaften WT, Mortensen JH, Karsdal MA, Bay-Jensen AC, et al. Misbalance in type III collagen formation/degradation as a novel serological biomarker for penetrating (Montreal B3) Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2017;46(1):26-39. doi: 10.1111/apt.14092.
8. Voitiv YaYu, Dzhemiliev A. Connective tissue pathology as a risk factor for intestinal fistula development. *East European Scientific Journal.* 2018;12(52):57-61.

9. Rosai J, *Surgical Pathology Seven edition Elsevier Inc. 2011;1(2,3):25-95.*

10. Dabbs D. *Diagnostic Immunohistochemistry, 4<sup>th</sup> Edition Theranostic and genomic applications. 2014;960.*

#### References

1. Schechter WP, Hirshberg A, Chang DS, et al. *Enteric fistulas: principles of management. J Am Coll Surg. 2009;209:484-91.*

2. Teixeira PGR, Inaba K, Dubose J, Salim A, Brown C, Rhee P, et al. *Enterocutaneous fistula complicating trauma laparotomy. A major resource burden. Am Surg. 2009;75(1):30-2.*

3. Schein M, Decker GA. *Postoperative external alimentary tract fistulas. Am J Surg. 1991;161(4):435-8.*

4. Rene G, John A. *Surgical treatment – evidence-based and problem-oriented. München, Germany: W. Zuckschwerdt Verlag Munchen. 2001;843.*

5. Whelan J, Ivatury R. *Enterocutaneous fistulas: an overview. Eur J Trauma Emerg Surg. 2011;37(3):251-8. doi: 10.1007/s00068-011-0097-2.*

6. Usenko OYu, Voitiv YaYu. *Chastota ta kryterii diahnozyky nedyferentsiiovanoi dysplazii spoluchnoi tkanyny u khvorykh khirurhichnoho stacionaru. Klinichna khirurgiia. 2017;10:5-7. (in Ukrainian). doi: https://doi.org/10.26779/2522-1396.2017.10.05.*

7. Van Haafden WT, Mortensen JH, Karsdal MA, Bay-Jensen AC, et al. *Misbalance in type III collagen formation/degradation as a novel serological biomarker for penetrating (Montreal B3) Crohn's disease. Aliment Pharmacol Ther. 2017;46(1):26-39. doi: 10.1111/apt.14092.*

8. Voitiv YaYu, Dzhemiliev A. *Connective tissue pathology as a risk factor for intestinal fistula development. East European Scientific Journal. 2018;12(52):57-61.*

9. Rosai J, *Surgical Pathology Seven edition Elsevier Inc. 2011;1(2,3):25-95.*

10. Dabbs D. *Diagnostic Immunohistochemistry, 4<sup>th</sup> Edition Theranostic and genomic applications. 2014;960.*

#### ГИСТОЛОГИЧЕСКИЙ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЙ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ У БОЛЬНЫХ С НАРУЖНЫМИ КИШЕЧНЫМИ СВИЩАМИ

**Резюме.** Обследовано 43 больных с тонко-, толстокишечными свищами и патологией соединительной ткани, которые лечились в ГУ «НИХТ им. А.А. Шалимова» на протяжении 2017-2020 гг. При комплексном исследовании фрагментов тканей тонкой и толстой кишок обнаружены похожие морфологические изменения в группах с фенотипическими признаками недифференцированной дисплазии соединительной ткани и с внешними кишечными свищами. При иммуногистохимическом исследовании тканей с моноклональными антителами к  $\alpha$ -SMA в обеих группах выявлено неравномерную, очаговую экспрессию в клетках гладкомышечной дифференцировки и фибробластов; с моноклональными антителами к Collagen IV отмечается умеренная положительная экспрессия в базальной мембране сосудов, в гладкомышечных клетках мышечного слоя стенки сосудов, в участках соединительной ткани, что является признаками патологического ремоделирования соединительной ткани.

**Ключевые слова:** недифференцированная дисплазия соединительной ткани, тонко-, толстокишечные свищи, гистологические, гистохимические маркеры.

#### HISTOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF CONNECTIVE TISSUE CHANGES IN PATIENTS WITH ENTEROCUTANEOUS FISTULA

**Abstract.** We examined 43 patients with enterocutaneous fistula and connective tissue pathology, who were treated in the Shalimov National Institute of Surgery and Transplantology during 2017-2020. With comprehensive study of tissue fragments small and large intestines revealed similar morphological characteristics in groups of phenotypic traits undifferentiated connective tissue dysplasia and with external intestinal fistula. In immunohistochemical study of tissues with monoclonal antibodies to  $\alpha$ -SMA in both groups revealed uneven focal expression in smooth muscle cells and fibroblast; with monoclonal antibodies to Collagen IV there is a moderate positive expression in the basement membrane of blood vessels, in smooth muscle cells of the muscular layer of the vascular wall, in areas of connective tissue, which are signs of pathological remodeling of connective tissue.

**Key words:** undifferentiated connective tissue dysplasia, enterocutaneous fistula, histological, histochemical markers.

*Відомості про авторів:*

**Войтів Ярослав Юрійович** – кандидат медичних наук, доцент кафедри хірургії та трансплантології НМАПО імені П.Л. Шупика; м. Київ;

**Усенко Олександр Юрійович** – доктор медичних наук, професор, директор ДУ «НІХТ ім. О.О. Шалімова» НАМН України, завідувач кафедри хірургії та трансплантології НМАПО імені П.Л. Шупика, м. Київ;

**Дядик Олена Олександрівна** – доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри патологічної та топографічної анатомії НМАПО імені П.Л. Шупика, м. Київ.

*Information about authors:*

**Voitiv Yaroslav Yu.** – Associate Professor, PhD, Department of Surgery and Transplantology, Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education, Kyiv, Ukraine;

**Usenko Oleksandr Yu.** – Professor, Dr. Sci, Director of Shalimov National Institute of Surgery and Transplantology, National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Head of department of Surgery and Transplantology, Kyiv, Ukraine;

**Dyadyk Olena Ol.** – Professor, MD, Dr. Sci., Head of department Pathologic and Topographic Anatomy department of the Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education, Kyiv, Ukraine.

Надійшла 25.11.2019 р.

Рецензент – проф. Гринчук Ф.В. (Чернівці)