

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РЕАКТИВНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ОКОЛОПУЗЫРНОЙ СТЕНКИ ПАРЕНХИМЫ ПЕЧЕНИ КРОЛИКОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ КАЛЬКУЛЁЗНОМ ХОЛЕЦИСТИТЕ

А. И. Бобоев^{1,2}, Ф. С. Орипов²

¹Сиабский техникум общественного здоровья имени Абу Али ибн Сина,

²Самаркандский государственный медицинский университет, Самарканд, Узбекистан

Ключевые слова: паренхима печени, иммуногистохимия, морфология, экспериментальные животные, жёлчный пузырь, калькулёзный холецистит.

Таянч сўзлар: жигар паренхимаси, иммуногистохимия, морфология, экспериментал хайвонлар, ўт пуфаги, калкулёз холецистит.

Key words: liver parenchyma, immunohistochemistry, morphology, experimental animals, gallbladder, calculous cholecystitis.

Одним из актуальных проблем современной медицины является заболевания органов желчевыделительной системы и печени, что до является до мало изученным. В последние время омолаживания различных патологических проявлений в гепатобилиарной системе при калькулёзном холецистите и увеличение частоты встречаемости данной патологии явилось причиной иммуногистохимического изучения нами околопузырной части паренхимы печени и стенки жёлчного пузыря. Для этого изучен фактор Ki67 характеризующий пролиферативную активность клеток и CD34 выражающий реакцию белка мембраны клеток. Полученные результаты оценены по специальной шкале и по следующим критериям: минимальный балл 0 (негативное появление), 1 балл (низко позитивное 10-30 %), 2 балла (средне позитивное 30-60%), 3 балла (высоко позитивное 60-100%). У контрольной группы животных выявлено 3-5 % слабо позитивная реакция на Ki67, средне позитивной и высоко позитивной реакции не было. Во всех случаях эксперимента в паренхиме печени и в стенке жёлчного пузыря отмечена до 8-10% слабо позитивная реакция Ki67. В гепатоцитах околопузырной части паренхимы отмечается жировая дистрофия, слабо окрашенность цитоплазмы, гипохромность ядер, неровность контуров гепатоцитов, увеличение плотности кровеносных сосудов фиброзной оболочки паренхимы. Отмечена позитивная реакция кровеносных сосудов на белок мембраны CD34. Относительная плотность кровеносных сосудов различного диаметра составило 50-60.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛ КАЛКУЛЁЗ ХОЛЕЦИСТИТДА ЎТ ПУФАГИ ОЛД ЁН ДЕВОРИ ЖИГАР ПАРЕНХИМАСИНИНГ ИММУНОГИСТОХИМИК ИММУНОГИСТОХИМИК РЕАКТИВ ЎЗГАРИШЛАРИ

А. И. Бобоев^{1,2}, Ф. С. Орипов²

¹Сиёб Абу Али ибн Сино номидаги Жамоат саломатлиги техникуми

²Самарканд давлат тиббиёт университети, Самарканд, Ўзбекистон

Замонавий тиббиётининг долзарб муаммоларидан бири бу жигар ва ўт чикарув йўллари тизими аъзоларининг касалликлари бўлиб, жаҳон соғлиқни сақлаш тизимида унинг ханузгача етарли даражада ўрганилмаган томонлари мавжуд. Калкулёз холециститда гепатобилиар тизим аъзоларида турли патологик ҳолатларининг аҳоли ўртасида ёшариб бораётганлиги, ҳамда бундай патологик жараёнларни натижасини ўрганиш мақсадида биз жигар паренхимаси ва ўт пуфаги олд деворидаги ўзгаришларни иммуногистохимик усулда ўргандик. Бунинг учун ҳужайранинг пролифератив фаоллигини белгиловчи Ki67 ва ҳужайра мембрана оксиди реакциясини аниқловчи CD34 антигенларидан фойдаланилди. Олинган маълумотлар махсус шкала ёрдамида баҳоланди: бунда минимал 0 балл (негатив), 1 балл (паст позитив 10-30 %), 2 балл (ўрта позитив 30-60%), 3 балл (юқори позитив 60-100%). Назорат гуруҳидаги хайвонларнинг барчасида Ki67 га 3-5% гача энгил даражали позитив реакция аниқланди, ўрта даражали ва юқори позитив реакция жарёнлари кузатилмади. Тажриба гуруҳида эса жигар паренхимаси ва ўт пуфаги деворида Ki67 - ўрганилганда, хайвонларнинг барчасида 8-10% гача энгил даражали позитив реакция кузатилди. Жигарнинг ўт пуфаги ён қисми паренхимаси гепатоцитларида ёғли дистрофия, гепатоцитларнинг оч рангдаллиги, ядролари гипохром, гепатоцитлар контурларининг ноте-кислиги, жигар паренхимаси ташки томондан фиброз тўқима билан қопланган бўлиб, қўплаб қон томирлар зичлигининг ошганлиги аниқланади. Қон томирларнинг CD34 – мембрана оксидига позитив реакцияси ўрганилди. Ҳар хил диаметрдаги қон томирларининг нисбий зичлиги 50-60 тани ташкил қилди.

IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF REACTIVE CHANGES IN THE PERI-VEESICAL WALL OF THE LIVER PARENCHYMA OF RABBITS WITH EXPERIMENTAL CALCULOUS CHOLECYSTITIS

A. I. Boboev^{1,2}, F. S. Oripov²

¹Siab College of Public Health named after Abu Ali ibn Sina,

²Samarkand state medical university, Samarkand, Uzbekistan

One of the pressing problems of modern medicine is diseases of the biliary system and liver, which have been poorly studied. Recently, the rejuvenation of various pathological manifestations in the hepatobiliary system with calculous cholecystitis and the increase in the incidence of this pathology was the reason for our immunohistochemical study of the peri-vesical part of the liver parenchyma and the wall of the gallbladder. For this purpose, factor Ki 67, which characterizes the proliferative activity of cells, and CD34, which expresses the reaction of the cell membrane

protein, were studied. The results obtained were assessed on a special scale and according to the following criteria: minimum score 0 (negative appearance), 1 point (low positive 10-30%), 2 points (average positive 30-60%), 3 points (highly positive 60-100%). In the control group of animals, a 3-5% weakly positive reaction to Ki 67 was detected; there was no moderately positive or highly positive reaction. In all cases of the experiment, up to 8-10% of the weakly positive Ki 67 reaction was observed in the liver parenchyma and in the wall of the gallbladder. In the hepatocytes of the peri-vesical part of the parenchyma, fatty degeneration, weakly stained cytoplasm, hypochromic nuclei, uneven contours of hepatocytes, and an increase in the density of blood vessels of the fibrous membrane were noted. A positive reaction of blood vessels to the membrane protein CD34 was noted. The relative density of blood vessels of different diameters was 50-60.

АКТУЛЬНОСТЬ. Изучение литературных данных данной проблемы показывает, что частота встречаемости патология печени и желчевыводящих путей остаётся высокой, привлекает внимание ведущих учёных мира.

Изучая характер камней у больных оперированных по поводу калькулёзного холецистита учёные установили, что пигментные и смешанные камни встречаются больше, чем холестериновые [3] Изучая больных с калькулёзным холециститом разделив их на две группы: больные с поздней холецистэктомией и больные с консервативным лечением установлено, что более эффективным явилось консервативное лечение [4].

У больных с механической желтухой при холелитиазе изменения слизистой оболочки жёлчных путей связывают с изучением и оценкой биохимических, окислительных и иммунных свойств желчи, подчеркивают значение морфологических изменений при выборе терапевтической тактики, оценке степени течения процесса, глубины и степени повреждения при остром холангите [2].

В результате изучения морфологических изменений в печени при калькулёзном холецистите у людей с ожирением определили, что степень дистрофических изменений в гепатоцитах и фиброза печени связаны со степенью воспалительного процесса в стенке жёлчного пузыря, эти реактивные изменения относительно сильнее и глубже выражены у людей с ожирением по сравнению с больными с нормальным весом тела (1).

Изучение отечественной и зарубежной литературы касающихся заболеваний гепатобилиарной системы показало недостаточную изучанность данной проблемы в практической и теоретической медицине, что привлекло наши внимание.

Мы решили изучая морфологические изменения печени и жёлчного пузыря кроликов и собак при экспериментальном калькулёзном холецистите провести сравнительный анализ проявления различной степени дистрофических изменений, их морфологические и морфометрические особенности в зависимости от характера жизни и питания, а также на основе полученных результатов выработать необходимые рекомендации.

Задача исследования: иммуногистохимическое изучение околопузырной части паренхимы и стенки жёлчного пузыря при экспериментальном калькулёзном холецистите.

Материал и методы исследования. Исследования проводились на 24 зрелых кроликах, 8 из которых составило контрольные животные и 16 с экспериментальным калькулёзным холециститом. Для достижения цели были использовано иммуногистохимическое исследование стенки жёлчного пузыря и околопузырной части паренхимы печени животных в норме и реактивные изменения при экспериментальном калькулёзном холецистите. Данное исследование проводилось в отделение патоморфологии РСНПМЦОиР Иммуногистохимическое исследование парафиновых срезов печени и жёлчного пузыря взятых у животных проводилось при помощи антигенов Ki 67 и CD34. Изучение антигенов Ki 67 и CD34 проведено с помощью иммуногистопроектора Bond Leica Australia (Австралия)

Эти антитела выполняют следующие функции:

Белок Ki67- является показателем пролиферации клеток и может быть использован в иммуногистохимии. Он связан с пролиферацией клеток и процессе интерфазы антиген Ki67 можно определить только в ядре клетки, а во время митоза большая часть белка переводится на поверхность хромосомы. Белок ядра Ki67 являясь признаком пролиферации опухолевых клеток оценивается в процентах. Ki67 часто используется для диагностирования злокачественных образований у людей.

Белок мембраны CD34 – это межклеточная адгезивная молекула играющая роль в начальных стадиях гематопоза. CD34 даёт углеводные лиганды для высокогликозирванных CD34 селектинов стволовых клеток.

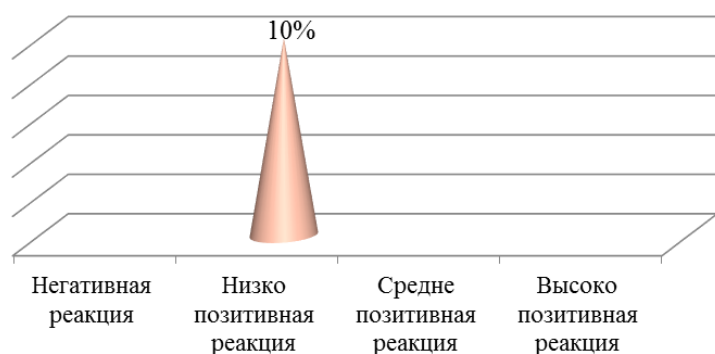
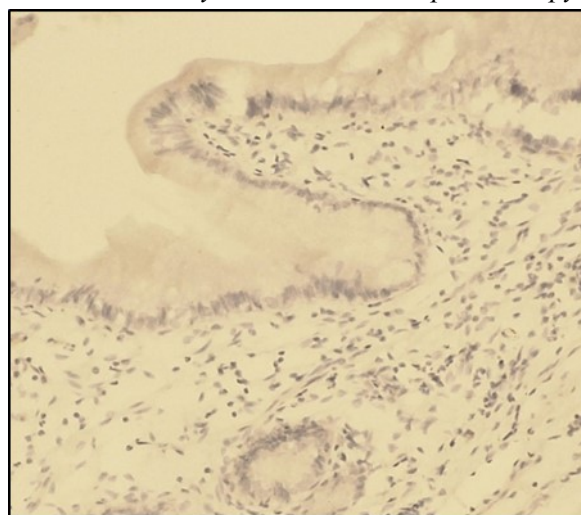


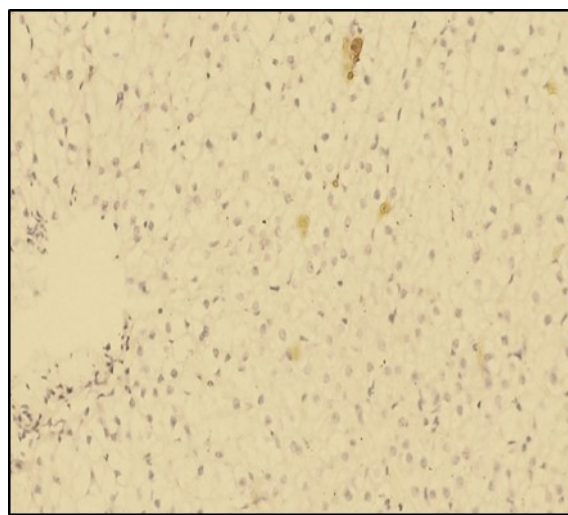
Рис. 1. Степень пролиферативной активности реагента Ki 67 у животных контрольной группы.

Иммуногистохимическое исследование проводится для анализа различных процессов. Полученные результаты оценены по методике ALLRED. Эти результаты по шкале от 1 до 3. Минимальный балл 0 (негативный), 1 балл (низко позитивный 10-30 %), 2 балла (средне позитивный 30-60%), 3 балла (высоко позитивный 60-100%).

Результаты исследования. В результате иммуногистохимического исследования Ki67 как показатель



А.



Б.

Рис. 2. Низко позитивная реакция реагента Ki 67 в стенке жёлчного пузыря (А) и паренхиме печени (Б) контрольных животных. ИГХ – Даб хромаген. Об10. Ок40.

пролиферативной активности клеток печени у животных контрольной группы полученные результаты степени окрашивания ядра клеток оценены по следующим критериям: ниже <10% это низкая активность, 10-20% средняя активность, выше >20% высокая пролиферативная активность.

Полученные результаты оценены как лёгкой, средней и тяжёлой степени позитивные реакции. У исследованных животных до 3-5 % составило лёгкой степени позитивная реакция, средней степени и тяжёлой позитивной реакции не наблюдалось (рис. 1, 2А).

При микроскопическом исследовании морфологических изменений стенки жёлчного пузыря и пристеночной паренхимы печени выявлено гиперплазия желёз слизистой оболочки жёлчного пузыря, полнокровие мелких кровеносных сосудов слизистой и подслизистой оболочек, в печени слабо коричневое окрашивание ядер гепатоцитов. В паренхиме печени кроликов слабое окрашивание гепатоцитов, гипохромность ядер, ровные контуры клеток (рис. 2Б).

Мембранный белок CD34 является адгезивной молекулой имеющий значение в ранних этапах гематопоэза. CD34 является элементом обеспечивающим прямую связь для матрицы стволовых клеток. Он является белком связывающим подобных себе гликанов. Изучение CD34 у контрольной группы животных также показало гиперплазию желёз стенки жёлчного пузыря, полнокровие кровеносных сосудов, гиперхромные ядра гепатоцитов, и слабое окрашивание цитоплазмы клеток, а также 100 % позитивную реакцию. Плотность распределения кровеносных сосудов составило 10-20 (относительное значение). Негативных реакций не выявлено (рис 3).

При иммуногистохимическом исследовании паренхимы печени и стенки жёлчного пузыря у экспериментальных животных признак пролиферативной активности клеток Ki 67 была обозначена в процентах. Окрашивание клеток было охарактеризовано было

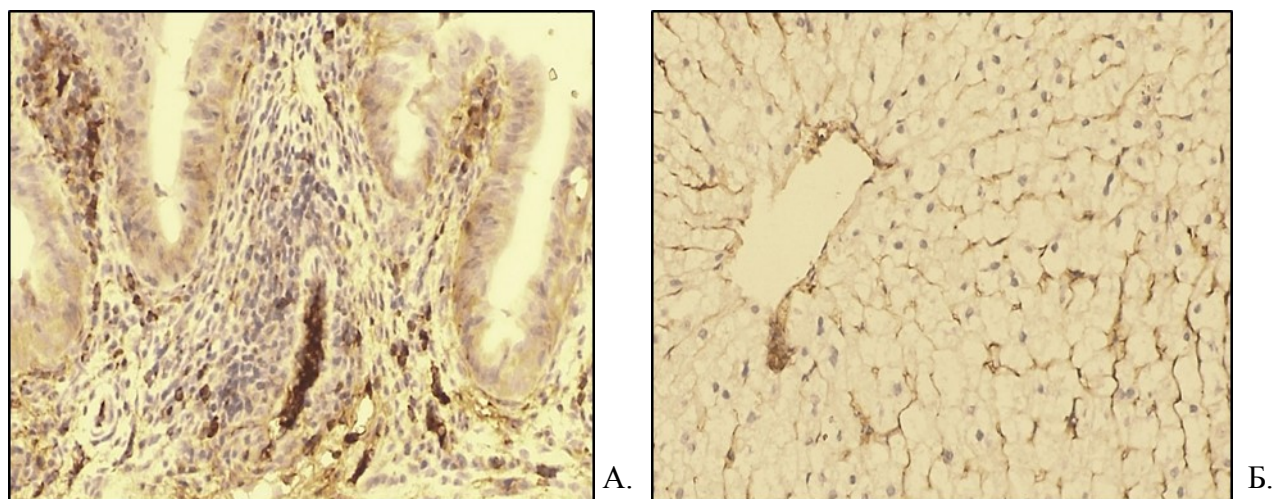


Рис. 3. Позитивная реакция реагента CD34 в стенке жёлчного пузыря (А) и ткани печени (Б) контрольной группы животных. ИГХ – Даб хромаген. Об10. Ок40.

Таблица 1.

Степень пролиферативной активности Ki 67 реагента у экспериментальной группы животных.

№	Степень пролиферативной активности	Результат
1.	<10% низкая активность	(8-10%)
2.	10-20% средняя активность	-
3.	>20% высокая пролиферативная активность	-

следующим образом. Ниже <10% низкая активность, 10-20% средняя активность, >20% высокая пролиферативная активность.

Полученные результаты были оценены в виде лёгкой, средней и тяжёлой степени позитивной реакции. У всех экспериментальных животных было отмечено до 8-10% лёгкой степени позитивная реакция, реакций средней степени и высокой позитивной реакции мы не наблюдали (таблица 1).

Под микроскопом наблюдаются атрофия желёз слизистой оболочки, резкое полнокровие кровеносных сосудов слизистой и подслизистой оболочек жёлчного пузыря, очаги воспалительной лимфоцитарной инфильтрации (рис. 4А). В гепатоцитах околопузырной части паренхимы кроликов наблюдаются признаки дистрофии, слабое окрашивание клеток, гипохромность ядер, жировая дистрофия, участки лимфоцитарной инфильтрации, фиброзные изменения в паренхиме печени (рис. 4Б).

Мембранный белок CD34 в печени контрольной группы животных выявил полнокровие кровеносных сосудов, гиперплазию желёз в стенке жёлчного пузыря, наблюдалось 100 % позитивная реакция. Под микроскопом наблюдалось гиперплазия желёз

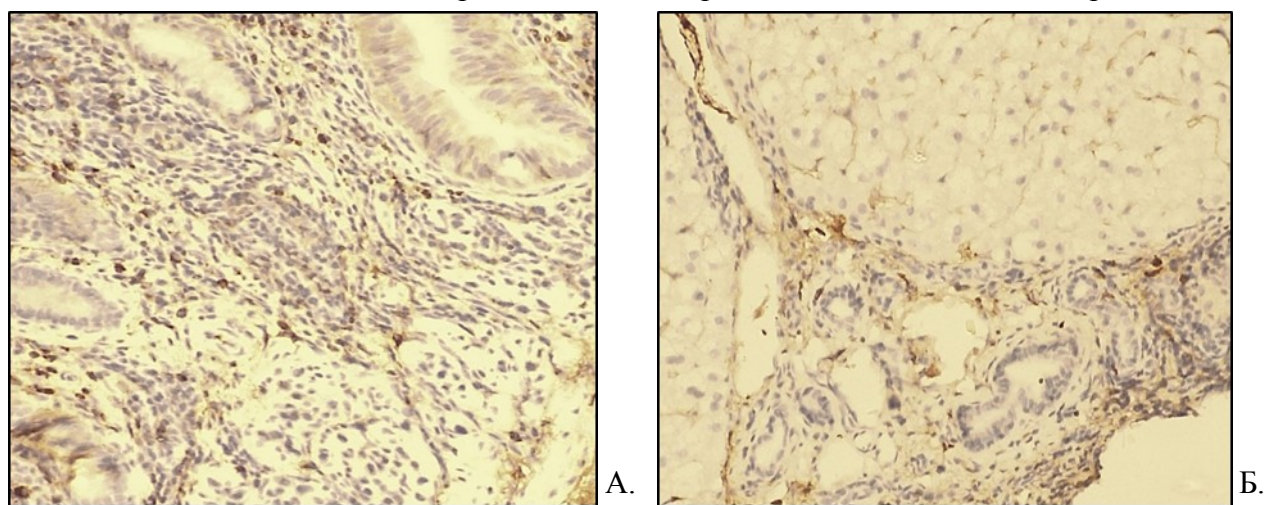


Рис. 4. Позитивная реакция низкой степени реагента Ki 67 в жёлчном пузыре (А) и паренхиме печени (Б) экспериментальной группы животных. ИГХ – Даб хромаген. Об10. Ок40.

жёлчного пузыря, участки ангиоматоза в окружающей ткани, в слизистой и подслизистой оболочке кровеносные сосуды различного диаметра. В слизистой и мышечной оболочках наблюдается кровеносные сосуды различного диаметра, плотность распределения которых составило 40-45 (в отн. плотности). Негативных реакций не наблюдалось (рис. 5А).

У экспериментальной группы животных в гепатоцитах околопузырной части паренхимы печени наблюдается жировая дистрофия, гипохромность ядер, резко светло окрашенная цитоплазма, фиброзное разрастание паренхимы, сужение кровеносных сосудов и повышение плотности их распределения. Позитивная реакция кровеносных сосудов (расм 5Б). Плотность распределения кровеносных сосудов различного размера составило 50-60.

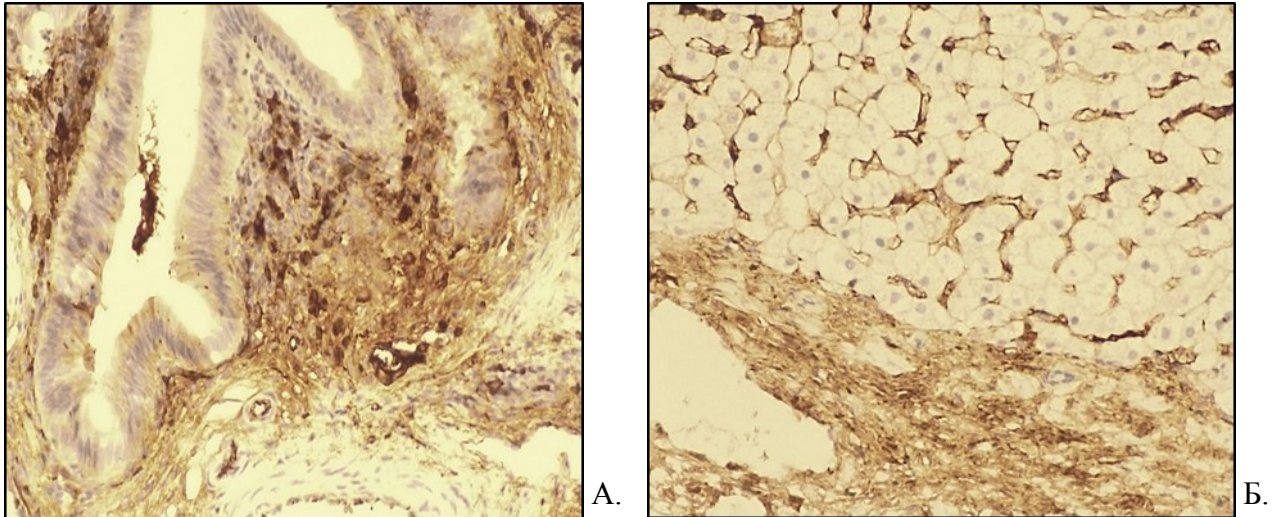


Рис. 5. Позитивная реакция реагента CD34 в желчном пузыре (А) и кровеносных сосудах печени (Б) экспериментальной группы животных. ИГХ – Даб хромаген. Об10. Ок40.

Вывод. У контрольной группы кроликов при иммуногистохимическом изучение паренхимы печени и стенки жёлчного пузыря отмечалось 3-5% легкой степени позитивная реакция реагента Кi 67 – признака пролиферативной активности и не наблядалось средней и высокой степени позитивные реакции.

У контрольной группы кроликов CD34 определил нормальное полнокровие кровеносных сосудов и гиперплазию желёз стенки жёлчного пузыря. У всех животных наблюдалось 100% позитивная реакция. Под микроскопом наблюдается гиперплазия желёз стенки жёлчного пузыря, различного диаметра кровеносных сосудов в слизистой и подслизистой оболочке плотность которых составило в среднем 10-20 на поле зрения микроскопа. Случаев негативной реакции не было. В гепатоцитах пристеночной части паренхимы наблюдалось гипохромность ядер, светлое окрашивание цитоплазмы, ровные и четкие контуры клеток, а также позитивная реакция кровеносных сосудов.

У экспериментальной группы животных в стенке жёлчного пузыря и в околопузырной части паренхимы отмечалось до 8-10% легкой степени позитивная реакция реагента Кi 67-отвечающего за степень пролиферативной активности клеток.

У экспериментальной группы животных в гепатоцитах околопузырной части паренхимы наблюдается жировая дистрофия, светлоё окрашивание цитоплазмы, гипохромность ядер, неровность контура клеток, фиброзное разрастание паренхимы, увеличение плотности распределения кровеносных сосудов. Отмечается позитивная реакция кровеносных сосудов на белка мембраны CD34. Плотность распределения кровеносных сосудов различного диаметра выросло и составило в среднем 50-60 (отн. показат).

Использованная литература:

1. Семерикова Н.А., Фрейд Г.Г., Попов А.В., Палатова Л.Ф., Ершова А.И. Особенности морфологических изменений печени у лиц с избыточной массой тела и калькулезным холециститом // Сибирский медицинский журнал, 2011, Том 26, № 4, Выпуск 2 С. 154-156.
2. Шахназаров М.А., Шахназаров А.М., Расулов М.Т., Магомедгаджиев Б.Г., Меджидов А.О. Морфологические и гистохимические изменения печени при ацетатной язве желудка и хроническом воздействии пестицида – гексахлорциклогексана // Медицинская экология Юг России: экология, развитие. №3, 2011 С. 112-117.
3. Olusegun I. Alatis, Eusebius I. Obiajunwa, Oladejo O. Lawal, Abdulrasheed R. K. Adesunkanmi. Particle-Induced X-ray Emission (PIXE) analysis of minor and trace elements in gallstones of Nigerian patients // Biol Trace Elem Res (2010) 134: S.13–24.
4. P.A. Leake, P.O. Roberts, K. Pitzul, J.M. Plummer. Should delayed cholecystectomy following acute calculous cholecystitis be discouraged in a resource-restricted setting? // West Indian Med J 2015; 64 (4): S.388-392.