

УДК 616.36+611-018.1:616.2-008.4]-053.31

Габор Г.Г., Боднар Я.Я., Марущак М.І., Єрмакова Т.В.

**Морфологічні аспекти вивчення апоптозу печінки при респіраторному дистрес-синдромі новонароджених**

ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України»

**Резюме.** У дослідженні встановлено особливості деструктивних змін печінки при різних клініко-морфологічних формах респіраторного дистрес-синдрому новонароджених. Комплексна оцінка отриманих результатів дає підстави дійти висновку, що патологічні зміни у печінці при пневмопатіях новонароджених реалізуються комплексом дистрофічних і деструктивних змін її паренхіматозних структур, які найбільш виражені при геморагічно-набряковому синдромі.

**Ключові слова:** респіраторний дистрес-синдром, печінка, легені, апоптоз, некроз.

**Постановка проблеми і аналіз останніх досліджень.** Кожен рік у світі реєструється понад 1 млн випадків респіраторного дистрес-синдрому (РДС), причому переважно у тих країнах, де високо розвинена медицина [1]. Причинами РДС можуть бути екзогенні чи ендогенні чинники різної природи, які здатні пошкодити епітелій респіраторних відділів легень та ендотелій мікроциркуляторного русла легеневої тканини [2]. У вагітних, породіль та новонароджених РДС розвивається з більшою вірогідністю і має, як правило, особливо тяжкий перебіг [3]. РДС розвивається стадійно у відповідь на ушкодження легень екзогенними або ендогенними факторами і характеризується прогресуючим некардіогенним набряком легень внаслідок ураження альвеоло-капілярних мембран, задишкою і гіпоксемією, стійкою до оксигенотерапії [4, 5].

Враховуючи смертність понад 40% навіть при негайному наданні найсучаснішої медичної допомоги, можна припустити, що реальна кількість випадків РДС у багатьох країнах з менш розвинутою медициною є вищою, що створює необхідність у систематизованому викладі відомостей про макроскопічні та мікроскопічні зміни легень та органів, що уражаються при РДС, що сприятиме уточненню безпосередньої причини смерті від захворювань легень. Останні дослідження в гепатології вказують на істотну роль інтенсифікації апоптозу гепатоцитів у патогенезі багатьох захворювань. Відомо, що апоптоз – це енергозалежний процес смерті окремих клітин, що відбувається як у нормальних, так і в змінених тканинах організму, та регулює оптимальну кількість клітин шляхом елімінації надлишкових чи функціонально аномальних клітин [6]. Тому дослідження апоптичних змін гепатоцитів за умови пневмопатій новонароджених відкриє можливості пошуку адекватних методів регулювання та корекції цих процесів.

**Мета дослідження** – встановити особливості деструктивних змін печінки при різних клініко-морфологічних формах респіраторного дистрес-синдрому новонароджених.

**Матеріал і методи дослідження**

Об'єктом дослідження були морфологічні зміни легень і печінки недоношених новонароджених, котрі померли у ранньому неонатальному періоді. Причиною смерті 17 дітей став ДС новонароджених: у 6 випадках патоморфологічно діагностовано полісегментарні ателектази легень (I дослідна група), у 5 – хвороба гіалінових мембран (II дослідна група), 6 – геморагічно – набряковий синдром (III дослідна група). Групу порівняння склали гістологічні препарати легень і печінки 4 новонароджених, які померли внаслідок гострих порушень мозкового кровообігу (контрольна група).

Для гістологічного дослідження шматочки з різних часток обох легень, правої і лівої частки печінки фіксували в 10% розчині забуференого нейтрального формаліну. Подальше проведення гістологічних препаратів здійснювалося згідно з загальноприйнятими методиками [7]. Виготовлення серійних парафінових зрізів товщиною 4-5 мкм проводилося на санному мікротомі. Депарафіновані препарати забарвлювали гематоксиліном і еозином.

Для дослідження можливих механізмів апоптозу гепатоцитів використано імуногістохімічне дослідження протеїну Bcl-2. Протокол забарвлення включав: депарафінізацію шматочків тканини на скло, блокування ендогенної пероксидази 3% розчином пероксиду водню, обробку предметного скла водою, блокування неспецифічних протеїнових сполук двома краплями 1% бичачого сироваткового антигену (BSA), промивання у фосфатному буфері рН 7,4 (PBS), обробку зрізів у цитратному буфері при рН 6,0 у мікрохвильовій печі, промивання в PBS-буфері, нанесення первинних антитіл до антигена Bcl-2 (фірма DAKO, Данія) на 1 год з наступним промиванням у PBS-буфері і нанесенням вторинних антитіл на 30 хв. Потім промивали у PBS-буфері, наносили 2 кр комплексу стрептавідин-пероксидази та інкубували протягом 30 хв, промивали й наносили АЕС-хромоген-розчин – інкубація від 5 до 20 хв до появи коричнево-червоного забарвлення з наступним дофарбовуванням гематоксиліном Майєра.

Інтенсивність реакції оцінювали напівкількісним методом у балах – від 0 до 3: 0 балів – немає забарвлення; 1 бал – слабе забарвлення; 2 бали – помірне забарвлення; 3 бали – виразне забарвлення.

**Результати дослідження та їх обговорення**

Для з'ясування особливостей ремоделювання печінки I дослідну групу склали випадки пневмопатій, що реалізувалися полісегментарними ателектазами легень. При цьому гістологічно виявлялися обширні ділянки безповітряної тканини зі значною кількістю злушення альвеолоцитів у просвіті альвеол. Просвіти альвеол і бронхіол переважно були представлені химерними щілинами. Строма повнокровна (рис. 1).

При імуногістохімічному дослідженні встановлено, що при полісегментарному ателектазичному ураженні легень новонароджених у печінці апоптичні процеси переважали в ендотеліоцитах, які набухали, приймали витягнуту форму, були гіперхромними. Апоптоз гепатоцитів незначний. Середній ступінь забарвлення на Bcl-2 у біоптатах печінки був нижчий від такого у нормі в 2,7 рази (рис. 2). Потрібно зауважити, що правильність постановки імуногістохімічної реакції підтверджувалася високою експресією протеїну Bcl-2 в окремих лімфоцитах портальних шляхів, що є нормальним [8].

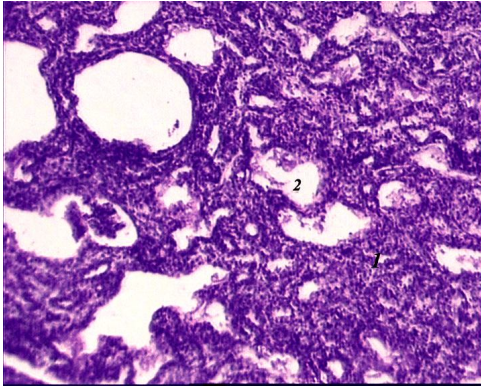
Ураження тканини легень у 2-й дослідній групі відповідали патоморфологічній картині хвороби гіалінових мембран. Легені були повнокровні. Альвеолоцити, а також війчастий епітелій окремих бронхіол були покриті ацидофільними масами різної щільності (рис. 3).

Структурна реорганізація печінки при хворобі гіалінових мембран характеризувалася наявністю ядер з очевидною маргінацією хроматину за відсутності ядерця, що вказує на характерні для апоптозу ранні морфологічні зміни. При гістохімічному дослідженні ступінь експресії білка Bcl-2 у біоптатах печінки був низький (менше, ніж 10% позитивно пофарбованих клітин). Це вказує на істотний дефіцит системи антиапоптичних білків ( $p < 0,05$ ), що пояснює високий рівень апоптозу гепатоцитів при даній патології (рис. 4).

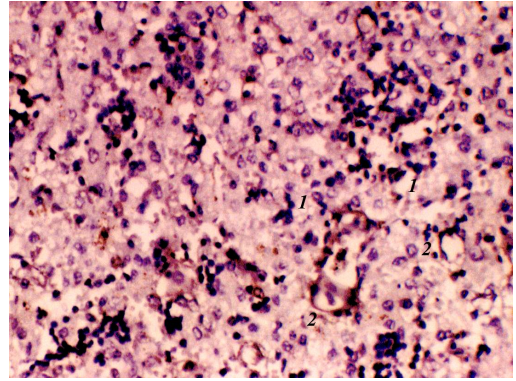
У новонароджених, смерть яких спричинив РДС у формі геморагічно-набрякового синдрому, структурно-функціональні зміни легень були максимально вираженими (рис. 5).

Деструктивні зміни печінки характеризувалися великою кількістю апоптично змінених гепатоцитів, які, на відміну від попередніх досліджень, розміщувалися групами по 2-3, мали різні розміри. Ядра приймали округлу форму і виглядали гіперхромними (рис. 6).

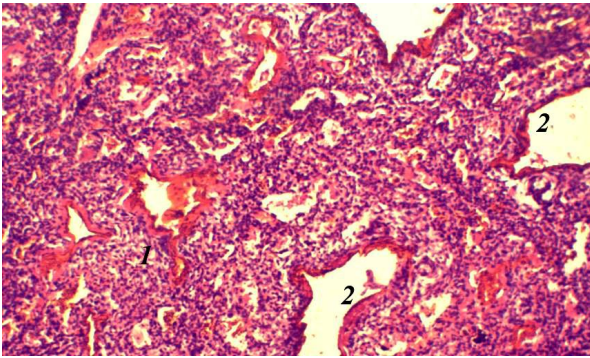
На протипагу наведеним даним імуногістохімічного дослідження, при полісегментарних ателектазах легень і хворо-



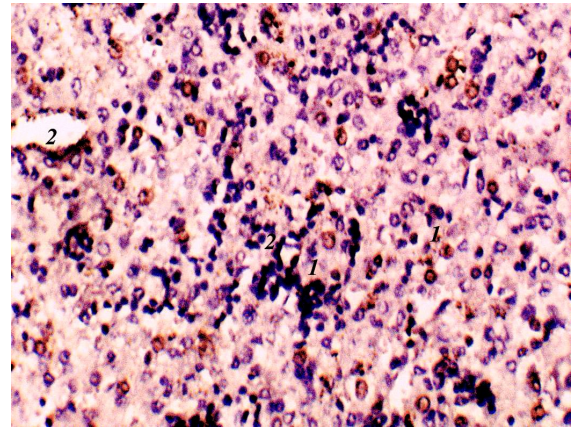
**Рис.1.** Структурна реорганізація легені при її полісегментарних ателектазах. Ділянка ателектазу (1), Злушені альвеоцити і слиз (2).Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб.: об. - 10, ок. - 10



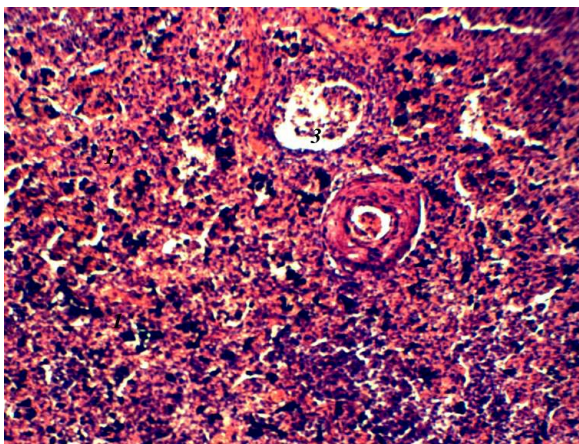
**Рис 2.** Структурна реорганізація печінки при полісегментарних ателектазах легень. Апоптоз гепатоцитів (1) і ендотеліоцитів (2). Імуногістохімія. Зб.: об. - 10, ок. - 20



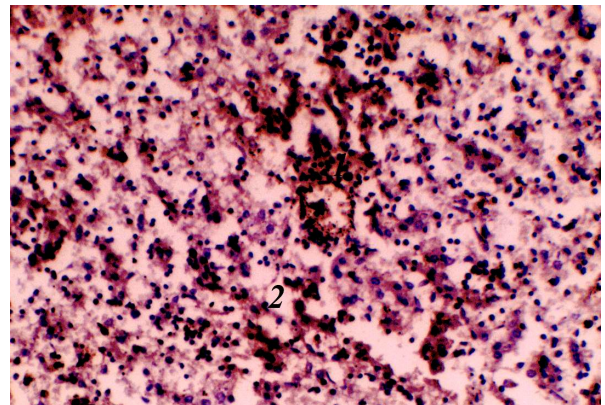
**Рис.3.** Структурна реорганізація легені при хворобі гіалінових мембран. Безповітряна тканина (1), гіалінові мембрани (2). Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб.: об. - 10, ок. - 10



**Рис 4.** Структурна реорганізація печінки при хворобі гіалінових мембран. Апоптоз гепатоцитів (1) і ендотеліоцитів (2). Імуногістохімія. Зб.: об. - 10, ок. - 20



**Рис.5.** Структурна реорганізація легені при геморагічно-набряковому синдромі. Еритроцити і лейкоцити (2) у просвіті альвеол і бронхіол (3).Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб.: Об.-10.Ок.- 10



**Рис 6.** Структурна реорганізація печінки при геморагічно-набряковому синдромі. Апоптоз гепатоцитів (1). Розширені просвіти синусоїдів (2). Імуногістохімія. Зб.: об. - 10, ок. - 20



бі галінових мембран виявлено здебільшого відсутність експресії Vcl-2 при геморагічно-набряковому синдромі, і лише в поодиноких гепатоцитах можна було візуалізувати слидове забарвлення.

При пневмопатіях новонароджених пригнічується вироблення сурфактанту внаслідок дистрофічних і деструктивних змін альвеолоцитів 2 типу, що зумовлює розвиток гіпоксії. Відомо, що паренхіматозні структури печінки плода і новонародженого характеризуються високою чутливістю до гіпоксії різного генезу, зазнаючи при цьому дистрофічних і дегенеративних змін [9]. Внаслідок утворення активних похідних кисню та оксиду азоту, активації оксидативного стресу і пероксидного окиснення ліпідів, зниження антиоксидантної спроможності ензимів, відбувається зниження трансмембранного потенціалу мітохондрій [10]. Це підвищує проникність зовнішньої мембрани мітохондрій для апоптогенних факторів, внаслідок чого в цитоплазму клітини починають надходити компоненти мітохондріального матриксу, серед яких ряд таких апоптогенних факторів, як цитохром С, прокаспазы 1, 3, 9 і АІF, який безпосередньо проникає у ядро, де викликає конденсацію хроматину і фрагментацію ядра [11].

Отже, пневмопатії новонароджених супроводжуються глибокими структурно-функціональними змінами тканини печінки, коли об'єм ураження залежить від важкості перебігу і форми пневмопатії, при цьому основних змін зазнають ендотеліоцити і гепатоцити. Чи буде цей стан реалізований до рівня фрагментації ДНК залежатиме від повноти каспазного каскаду реакцій, які завершуються активацією ендонуклеаз. Отримані дані можуть свідчити про те, що гепатоцити при досліджуваних патологіях знаходяться на різних етапах каскаду апоптозного циклу, а також про різний ступінь порушення регуляторних механізмів апоптозу, залежно від патоморфологічної форми РДС.

### Висновок

Комплексна оцінка отриманих результатів дає підстави дійти висновку, що патологічні зміни у печінці при пневмопатіях новонароджених реалізуються комплексом дистрофічних і деструктивних змін її паренхіматозних структур, які найбільш виражені при геморагічно-набряковому синдромі.

### Перспективи подальших досліджень

У перспективі планується поглибити знання щодо структурно-функціональних змін тканини печінки за умови РДС гістохімічним методом шляхом дослідження рівня експресії білка Вах у біоптатах печінки.

### Література

1. Matthay M. A. The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment / M. A. Matthay, R. L. Zemans // Annu. Rev. Pathol. – 2011. – Vol. 6. – P. 147-163.
2. Incidence and outcomes of acute lung injury / G. D. Rubenfeld, E. Caldwell, E. Peabody [et al.] // N. Engl. J. Med. – 2005. – Vol. 353, № 16. – P. 1685-1693.

3. Горошко О.І. Клінічна характеристика і фактори ризику респіраторного дистрес-синдрому у недоношених новонароджених / О.І. Горошко // Перинатология и педиатрия. – 2010. – №3 (43). – С. 53-57.

4. Blank R. Epidemiology of ARDS and ALI / R. Blank, L. M. Napolitano // Crit. Care Clin. – 2011. – Vol. 27, № 3. – P. 439-458.

5. Regulation of vascular endothelial growth factor bioactivity in patients with acute lung injury / G. D. Perkins, J. Roberts, D. F. McAuley [et al.] // Thorax. – 2005. – Vol. 60 (2). – P. 153-158.

6. Mittal N. Exogenous surfactant prevents the mitochondrial depolarization and changes in calcium homeostasis due to oxidative stress that leads to apoptosis in experimental lung injury / N. Mittal, S. N. Sanyal // ПІОАВЖ. – 2012. – Vol. 1. – P. 3-10.

7. Сорочинников А. П. Гистологическая и микроскопическая техника : руководство / А. П. Сорочинников, А. Е. Доросевич. – Смоленск : САУ, 2000. – 476 с.

8. Хухліна О. С. Інтенсивність процесів апоптозу та проліферації гепатоцитів при неалкогольному стеатозі печінки і стеатогепатиті у хворих на цукровий діабет 2 типу / О. С. Хухліна, І. С. Давиденко // Сучасна гастроентерологія. – 2005. – № 3 (23). – С. 26–30.

9. Schultz D.R., Harrington W.J. Apoptosis: Programmed cell death at a molecular level // J. Seminars in Arthritis and Rheumatism. — 2003. — Vol. 32, N 6. — P. 345—369.

10. Характеристика змін проникності мембран мітохондрій з тканини папілярних карцином щитоподібної залози та з її тканини за інвазії пухлинних клітин / Т. М. Мишуніна, О. В. Калініченко, М. Д. Тронько, Л. Ю. Зурнаджи // Журн. АМН України. – 2010. – Т. 16, № 1. – С. 5-22.

11. Duchen M. R. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death / M. R. Duchen // J. Physiol. – 2000. – Vol. 529. – P. 57-68.

*Габор Г.Г., Боднар Я.Я., Марущак М.І., Ермакова Т.В.*

### Морфологические аспекты изучения апоптоза печени при респираторном дистресс-синдроме новорожденных

**Резюме.** В исследовании установлено особенности деструктивных изменений печени при различных клинико-морфологических формах респираторного дистресс-синдрома новорожденных. Комплексная оценка полученных результатов позволяет сделать вывод, что патологические изменения в печени при пневмопатиях новорожденных реализуются комплексом дистрофических и деструктивных изменений ее паренхиматозных структур, которые наиболее выражены при геморрагически-отечном синдроме.

**Ключевые слова:** респираторный дистресс-синдром, печень, легкие, апоптоз, некроз.

*G.G. Gabor, Y.Y. Bodnar, M.I. Marushchak, T.V. Yermakova*

### Morphological Aspects of Liver Apoptosis Investigation during Respiratory Distress Syndrome in Newborns

**Summary.** The peculiarities of destructive changes in the liver in different morphological forms of respiratory distress syndrome of newborns were studied. Comprehensive assessment of the results suggests the conclusion that the pathological changes in the liver pneumopathy of newborn are realized by a complex of degenerative and destructive changes of parenchymal structures, which are dominated in hemorrhagic edema syndrome.

**Keywords:** respiratory distress syndrome, liver, lungs, apoptosis, necrosis.

Надійшла 01.03.2013 року.