І. І. Яковцова¹,
С. В. Данилюк¹,
П. М. Замятін³,
Р. М. Михайлусов¹,
В. В. Негодуйко²,
Ю. В. Бунін²

¹Харківська медична академія
післядипломної освіти

²Військово-медичний клінічний
центр Північного регіону
МО України, м. Харків

³ДУ «Інститут загальної
та невідкладної хірургії
ім. В. Т. Зайцева НАМНУ»,
м. Харків

© Колектив авторів

ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ЛЕГЕНЬ ПРИ ВОГНЕПАЛЬНИХ ПРОНИКАЮЧИХ ПОРАНЕННЯХ

Реферат. *Мета дослідження* — проаналізувати дані імуногістохімічних досліджень легень після вогнепального проникаючого поранення в різні терміни.

Матеріали та методи. Досліджено тканини легень, видалені у поранених разом з інкапсульованим стороннім тілом або без стороннього тіла вогнепального походження в період від 1 доби до 10 місяців після поранення.

Результати та їх обговорення. У 1 добу після поранення в ушкоджених ділянках починає накопичуватись патологічний колаген IV типу та трансформуючий фактор росту. На 2 добу поранення виявляється незначне підвищення експресії TGF- β 1 та Collagen IV, VEGF практично не продукується, кількість CD68+ макрофагів зростає. 10 доба характеризується прогресуючим підвищенням вмісту трансформуючого фактору росту в лейкоцитах, лімфоцитах, фібробластах, макрофагах та колагену IV типу у навколоранових осередках. Через 10 місяців після моменту поранення та проведення оперативного втручання рановий канал являв собою велику зону щільної сполучної тканини з наявністю поодиноких судин венозного типу частіше без м'язового шару. Трансформуючий фактор росту демонстрував виражену експресію у макрофагах та ендотелії судин, тоді як VEGF виявлявся у вигляді слабкої позитивної реакції в ендотеліоцитах судин, та поодиноких макрофагах. Колаген IV типу залишався між волокнами щільної фіброзної тканини, яка заміщувала рановий канал, а також виявлявся у стінках судин, міжальвеолярних перетинках, фібробластах прилеглої паренхіми легень.

Висновки. 1. Травматичні порушення у паренхімі легень при ВППГ вже у перші години від моменту поранення супроводжуються накопиченням CD68+-макрофагів, які зберігаються і через 10 місяців від моменту ВППГ та стають основними продуцентами TGF- β 1 і VEGF.

2. Трансформуючий фактор росту TGF- β 1 і судинно-ендотеліальний фактор росту VEGF виявляються у великій кількості у макрофагах, лейкоцитах, лімфоцитах, фібробластах та ендотелії судин з першої доби травматизації паренхіми легень; до 10 доби експресія TGF- β 1 стає значною, тоді як VEGF слабо маркує ендотеліоцити капілярів, артеріол, поодинокі макрофаги. Така імуногістохімічна картина пояснює довготривалий період загоєння ВППГ.

3. Вміст патологічного колагену IV типу Collagen IV у першу добу вогнепального поранення є мінімальним, зростає до 10 доби та виявляється у полях фіброзу та дистелектазів паренхіми легень через 10 місяців.

4. Визначення ІГХ-методом експресії CD68, TGF- β 1, VEGF та Collagen IV у перші 10 діб від моменту ВППГ та на подальших етапах лікування поранених допоможе прогнозувати перебіг бойової травми і коригувати методи її терапії.

Ключові слова: імуногістохімічні дослідження, легень, вогнепальне поранення.

Вступ

Вогнепальне проникаюче поранення грудей (ВППГ) вважається одним з найважчих, має високий рівень летальності в порівнянні з тупою травмою [1], історично рівень смертності від цих поранень перевищує 50 % [2, 3]. Рання смертність зазвичай була зумовлена крововтратою, шоком та катастрофічними травмами внутрішніх органів. Вогнепальні поранення грудей у загальній структурі бойової хірургічної травми за даними АТО та ООС на сході України становлять 11,7 %, переважну більшість з них складають непроникаючі поранення (83,6 %) [4]. Використання гістохімічних методів дослідження тканин дозволяє більш детально визначити патоморфологічні зміни в тканинах [5], прогнозувати перебіг бойової травми і коригувати тактику, обсяг [6] та методики [7] надання медичної допомоги на етапах медичної евакуації в умовах обмежених бойових дій [8].

Мета досліджень

Проаналізувати дані імуногістохімічних досліджень легень після вогнепального проникаючого поранення в різні терміни.

Матеріали та методи досліджень

Матеріалом для дослідження були тканини легені, видалені у поранених разом з інкапсульованим стороннім тілом або без стороннього тіла вогнепального походження в період від 1 доби до 10 місяців після поранення. Із 32 видалених сторонніх тіл, в 1 випадку стороннє тіло видалено з капсулою в легені, в 31 випадку — тільки ушкоджені тканини легені.

Для деталізації морфологічних змін застосовували імуногістохімічний (ІГХ) метод. Низькомолекулярні цитокератини (Cytokeratin PAN AE1/AE3, мишачі моноклональні антитіла МКАТ фірми Thermo scientific, Німеччина, Ready-to-Use) використовували для візуалізації епітеліальних структур альвеол легень. Експресію трансформуючого фактора росту, як маркера хронізації запального процесу в рановому каналі, визначали з використанням первинних кроличих поліклональних антитіл (ПКАТ) до TGF- β 1 (V) Antibody (Thermo scientific), Ready-to-Use. Тенденцію до утворення патологічного типу колагену для вивчення «зрілості» грануляційної тканини в досліджуваних зразках визначали за допомогою МКАТ до Collagen IV (CIV22) фірми DAKO (Данія), титр антитіл 1:50. Тенденції та особливості ангиогенезу в тканинах вивчалися за експресією фактору росту ендотелію судин (VEGF (VG1), титр антитіл 1:50 (МКАТ, DAKO). Особливості імунних клітинних реакцій в зонах запального процесу із застосуванням маркера макрофагів CD68 (KPI) (МКАТ, DAKO, Ready-to-Use).

Матеріал для дослідження методами ІГХ фіксувався в 10 % розчині нейтрального формаліну, забуференого фосфатним буфером. Потім матеріал піддавався стандартній проводці етанолами зростаючої концентрації, хлороформом, після чого заливався парафіном. З парафінових блоків виготовлялися серійні зрізи товщиною 3–4 мкм, які наносили на високоадгезивні скельця Super Frost і висушували при температурі 37 °C протягом 18 годин. Демаскуюча термічна обробка була виконана за методом кип'ятіння зрізів в цитратному буфері (pH 6,0). Для візуалізації первинних антитіл застосовувалася система детекції UltraVision Quanto Detection Systems HRP Polymer (Thermo scientific). Як хромоген використовувався DAB (діамінобензидин). Для оцінки ІГХ мітки використовували напівкількісну шкалу. Результати підраховували за допомогою окулярної сітки Автанділова [9] у 10 довільно вибраних полях зору при збільшенні $\times 400$. Оцінку ІГХ-мітки робили за ступенем поширення і інтенсивністю коричневого фарбування в мікропрепаратах: негативною (0) вважалася реакція при відсутності фарбування специфічних структур клітини, слабкою позитивною (1+) вважалася реакція при слабкому або осередковому фарбуванні від 0 до 30 % клітин, помірною позитивною (2+) — при достатньому або осередковому фарбуванні 30–60 % клітин, вираженою або дифузійною (3+) вважалася реакція при фарбуванні 60–90 % клітин. Комплекс імуногістохімічних досліджень проводився на мікроскопі Primo Star (Carl Zeiss) з використанням програми AxioCam (ERc 5s).

Результати досліджень та їх обговорення

При імуногістохімічному дослідженні тканини легень при ВППГ нами встановлено наступне. У перші години поранення десквамований альвеолярний епітелій на тлі некрозу та запальної інфільтрації втрачає свої гістогенетичні властивості, що ілюструється зниженням експресії низькомолекулярних цитокератинів (рис. 1).

Рис. 1. Слабка нерівномірна експресія низькомолекулярних цитокератинів у альвеолоцитах у перший день поранення
Реакція з МКАТ до Cytokeratin PAN AE1/AE3, $\times 100$

Звертає на себе увагу значна перевага макрофагів у запальному інфільтраті (рис. 2).

Травмовані осередки паренхіми легень практично не продукують судинно-ендотеліальний фактор росту, що підтверджується слабкою експресією відповідного маркеру (рис. 3).

Навіть у першу добу після поранення в ушкоджених ділянках починає накопичуватись патологічний колаген IV типу та трансформуючий фактор росту (рис. 4).

На другу добу поранення у навколорановій зоні виявляється незначне підвищення експресії TGF- β 1 та Collagen IV, VEGF у цих ділянках практично не продукується. Кількість CD68+ макрофагів зростає, формуючи прошарок відокремлення від мас фібриноїдних некрозів, геморагій та дистелектазів (рис. 5).

Десята доба від епізоду поранення характеризувалася прогресуючим підвищенням вмісту трансформуючого фактору росту в лейкоцитах,

лімфоцитах, фібробластах, макрофагах та колагену IV типу у навколоранових осередках (рис. 6, 7).

Через 10 місяців після моменту поранення та проведення оперативного втручання рановий канал уявляв собою велику зону щільної сполучної тканини з наявністю поодиноких судин венозного типу частіше без м'язового шару. Численні макрофаги виявлялись переважно периваскулярно (рис. 8).

Трансформуючий фактор росту демонстрував виражену експресію у макрофагах та ендотелії судин, тоді як VEGF виявлявся у вигляді слабкої позитивної реакції в ендотеліоцитах судин, та поодиноких макрофагах (рис. 9, 10).

Колаген IV типу залишався між волокнами щільної фіброзної тканини, яка заміщувала рановий канал, а також виявлявся у стінках судин, міжальвеолярних перетинках, фібробластах прилеглої паренхіми легень (рис. 11).

Рис. 2. Велика кількість макрофагів у просвітах альвеол зони геморагії ушкодженої легені у першу добу поранення. Реакція з МКАТ до CD68 (KP1), $\times 100$

Рис. 3. Слабка експресія VEGF у ендотелії судин, поодиноких макрофагах та альвеолоцитах у першу добу поранення. Реакція з МКАТ до VEGF (VG1), $\times 400$

Рис. 4. Помірна експресія колагену IV типу та трансформуючого фактору росту у стінках судин, ендотеліоцитах, макрофагах, міжальвеолярних перетинках; перша доба поранення. Реакція з МКАТ до Collagen IV (CIV22) (ліворуч), реакція з ПКАТ до TGF- β 1(V) (праворуч), $\times 400$

Рис. 5. Множинні макрофаги субплевральної зони пошкодження (геморагії, дистелектази, емфізема, плевра значно потовщена); друга доба поранення. Реакція з МКАТ до CD68 (KP1), $\times 100$

Рис. 6. Виражена експресія TGF- $\beta 1$ у ділянці легені, прилеглої до геморагічних мас; 10 доба поранення. Реакція з ПКАТ до TGF- $\beta 1$ (V), $\times 400$

Рис. 7. Виражена експресія колагену IV типу у ділянці легені, прилеглої до ателектазів; 10 доба поранення. Реакція з МКАТ до Collagen IV (CIV22), $\times 400$

Рис. 8. Численні макрофаги щільної рубцевої тканини через 10 місяців після поранення. Реакція з МКАТ до CD68 (KP1), $\times 400$

Рис. 9. Виражена експресія трансформуючого фактору росту у ендотелії судин та макрофагах через 10 місяців після поранення. Реакція з ПКАТ до TGF- $\beta 1$ (V), $\times 400$

Рис. 10. Слабка експресія судинно-ендотеліального фактору росту у ендотелії судин та макрофагах сполучної тканини навколо кіптяви через 10 місяців після поранення. Реакція з МКАТ до VEGF (VG1), $\times 400$

Висновки

1. Травматичні порушення у паренхімі легень при ВППГ вже у перші години від моменту поранення супроводжуються накопиченням CD68⁺-макрофагів. До кінця другої-третьої доби CD68⁺-макрофаги розташовуються компактно у демаркаційній зоні, відмежуючи осередки геморагій та некрозів від фокусів дис-і ателектазів. CD68⁺-макрофаги зберігаються у розповсюджених ділянках фіброзу і через

10 місяців від моменту ВППГ та стають основними продуцентами TGF- $\beta 1$ і VEGF.

2. Трансформуючий фактор росту TGF- $\beta 1$ і судинно-ендотеліальний фактор росту VEGF виявляються у великій кількості у макрофагах, лейкоцитах, лімфоцитах, фібробластах та ендотелії судин з першої доби травматизації паренхіми легень; до 10 доби експресія TGF- $\beta 1$ стає значною, тоді як VEGF слабо маркує ендотелію капілярів, артеріол, поодинокі макро-

Рис. 11. Виразена експресія колагену IV типу у сполучній тканині, сформованої навколо кіптяви, через 10 місяців після поранення. Реакція з МКТ до Collagen IV (CIV22), $\times 400$

фаги. Така імуногістохімічна картина пояснює довготривалий період загоєння ВППГ: в умовах хронізації запального процесу навколоранові осередки тканини легень стають неспроможними до неогенезу.

3. Вміст патологічного колагену IV типу Collagen IV у першу добу вогнепального поранення є мінімальним, зростає до 10 доби та виявляється у полях фіброзу та дистелектазів паренхіми легень через 10 місяців. Його на-

явність також може обумовлювати слабкий потенціал заміщення ранового каналу сполучнотканинним рубцем.

4. Визначення ІГХ-методом експресії CD68, TGF- β 1, VEGF та Collagen IV в невеликих шматочках тканини легень, вилучених під час VATS, у перші 10 діб від моменту ВППГ та на подальших етапах лікування поранених допоможе прогнозувати перебіг бойової травми і коригувати методи її терапії.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Невідкладна військова хірургія. Українське видання. Інститут Бордена. Центр і школа Медичного управління СВ США Форт Сем Г'юстон, штат Техас, 2015; 221-7.
2. Ahmed Mostafa El Saied and Waleed Hassan Rizk. Penetrating Chest Injuries after Egyptian Revolution. Clinics in surgery.2020;5:1082-5.
3. Aram Baram, Fahmi H. Kakamad. Bilateral thoracic trauma; presentation and management, a case series. Ann Med Surg (Lond).2019;43:25-8.
4. Хоменко ІП, Гержик КП, Кучер БМ. Місце та роль відеоторакоскопічних оперативних втручань при бойових пораненнях та травмах органів грудної клітки. Вісник Вінницького національного медичного університету. 2018; 22(3):522-4.
5. Цимбалюк ВІ, ред. Вогнепальні поранення м'яких тканин (досвід антитерористичної операції / операції об'єднаних сил). Харків: Колеріум; 2020, 400 с.
6. Tamas F. Molnar. Thoracic damage control surgery. Journal of Thoracic Disease.2019;11(2):158-66.
7. John P Lichtenberger, Andrew M Kim, Dane Fisher, Peter S Tatum, Brian Neubauer, P Gabriel Peterson, Brett W Carter. Imaging of Combat-Related Thoracic Trauma – Blunt Trauma and Blast Lung Injury. Military Medicine.2018; 183(3-4):89-96.
8. Muharrem Zakmak, Mehmet Nail Kandemirli. Study of 433 Operated Cases of Thoracic Trauma. Indian J Surg.2016;78(6):477-81.
9. Автандилов ГГ. Основы количественной патологической анатомии. М.: Медицина; 2002, 240 с.

REFERENCES

1. Nevidkladna vijs'kova hirurhiya. Ukraïns'ke vidannya. Institut Bordena. Centr i shkola Medichnogo upravlinnya SV SSHA Fort Sem G'yuston, shtat Tekhas, 2015; 221-7.
2. Ahmed Mostafa El Saied and Waleed Hassan Rizk. Penetrating Chest Injuries after Egyptian Revolution. Clinics in surgery.2020;5:1082-5.
3. Aram Baram, Fahmi H. Kakamad. Bilateral thoracic trauma; presentation and management, a case series. Ann Med Surg (Lond).2019;43:25-8.
4. Homenko IP, Gerzhik KP, Kucher BM. Misce ta rol' videotorakoskopichnih operativnih vtruchan' pri bojovih poranennyah ta travmah organiv grudnoï klitki. Visnik Vinnic'kogo nacional'nogo medichnogo universitetu. 2018; 22(3):522-4. [In Ukr.].
5. Cimbalyuk VI, red. Vognepal'ni poranennya m'yakih tkanin (dosvid antiteroristichnoï operaciï / operaciï ob'ednanih sil). Harkiv: Kolegium; 2020, 400 s. [In Ukr.].
6. Tamas F. Molnar. Thoracic damage control surgery. Journal of Thoracic Disease.2019;11(2):158-66.
7. John P Lichtenberger, Andrew M Kim, Dane Fisher, Peter S Tatum, Brian Neubauer, P Gabriel Peterson, Brett W Carter. Imaging of Combat-Related Thoracic Trauma – Blunt Trauma and Blast Lung Injury. Military Medicine.2018; 183(3-4):89-96.
8. Muharrem Zakmak, Mehmet Nail Kandemirli. Study of 433 Operated Cases of Thoracic Trauma. Indian J Surg.2016;78(6):477-81.
9. Avtandilov GG. Osnovy kolichestvennoj patologicheskoy anatomii. M.: Medicina; 2002, 240 s. [In Rus.].

ИММУНОГИСТО-
ХИМИЧЕСКИЕ
ИССЛЕДОВАНИЯ ЛЕГКИХ
ПРИ ОГНЕСТРЕЛЬНЫХ
ПРОНИКАЮЩИХ
РАНЕНИЯХ

*И. И. Яковцова,
С. В. Данилюк,
П. Н. Замятин,
Р. М. Михайлуков,
В. В. Негодуйко,
Ю. В. Бунин*

Реферат. *Цель исследования* — проанализировать данные иммуногистохимических исследований легких после огнестрельного проникающего ранения в разные сроки.

Материалы и методы. Исследовались ткани легких, удаленные у раненых вместе с инкапсулированным инородным телом или без постороннего тела огнестрельного происхождения в период от 1 суток до 10 месяцев после ранения.

Результаты и их обсуждение. В 1 сутки после ранения в поврежденных участках начинает накапливаться патологический коллаген IV типа и трансформирующий фактор роста. На 2 сутки ранения обнаруживается незначительное повышение экспрессии TGF- β 1 и Collagen IV, VEGF практически не наблюдается, количество CD68+-макрофагов растет. 10 сутки характеризовались прогрессирующим повышением содержания трансформирующего фактора роста в лейкоцитах, лимфоцитах, фибробластах, макрофагах и коллагена IV типа в околораневых очагах. Через 10 месяцев после ранения и проведения оперативного вмешательства раневой канал представлял собой большую зону плотной соединительной ткани с наличием редких сосудов венозного типа чаще без мышечного слоя. Трансформирующий фактор роста демонстрировал выраженную экспрессию в макрофагах и эндотелии сосудов, тогда как VEGF наблюдался в виде слабой положительной реакции в эндотелиоцитах сосудов и редких макрофагах. Коллаген IV типа оставался между волокнами плотной фиброзной ткани, которая замещала раневой канал, а также обнаруживался в стенках сосудов, межальвеолярных перегородках, фибробластах прилегающей паренхимы легких.

Выводы. 1. Травматические нарушения в паренхиме легких при ОНР уже в первые часы с момента ранения сопровождаются накоплением CD68+-макрофагов, которые сохраняются и через 10 месяцев с момента ОНР и становятся основными продуцентами TGF- β 1 и VEGF.

2. Трансформирующий фактор роста TGF- β 1 и сосудисто-эндотелиальный фактор роста VEGF оказываются в большом количестве в макрофагах, лейкоцитах, лимфоцитах, фибробластах и эндотелии сосудов с первого дня травматизации паренхимы легких; к 10 суткам экспрессия TGF- β 1 становится значительной, тогда как VEGF слабо маркирует эндотелиоциты капилляров, артериол, единичные макрофаги. Такая иммуногистохимическая картина объясняет длительный период заживления ОНР.

3. Содержание патологического коллагена IV типа Collagen IV в первые сутки огнестрельного ранения является минимальным, возрастает до 10 суток и оказывается в полях фиброза и дистелектаз паренхимы легких через 10 месяцев.

4. Определение ИГХ-методом экспрессии CD68, TGF- β 1, VEGF и Collagen IV в первые 10 дней с момента ОНР и на последующих этапах лечения раненых поможет прогнозировать ход боевой травмы и корректировать методы ее терапии.

Ключевые слова: *иммуногистохимические исследования, легкие, огнестрельное ранение.*

IMMUNOGISTOCHEMICAL STUDIES OF THE LUNGS IN FIRE PENETRATION INJURIES

**I. I. Yakovtsova,
S. V. Danilyuk, P. M. Zamyatin,
R. M. Mikhailusov,
V. V. Negoduyko,
Y. V. Bunin**

Summary. *The aim of the study was to analyze the data of immunohistochemical studies of the lungs after a gunshot wound penetrating at different times.*

Materials and methods. Lung tissue removed from the wounded with an encapsulated foreign body or without a foreign body of fire origin in the period from 1 day to 10 months after injury was studied.

Results and discussion. At 1 day after injury, pathological type IV collagen and transforming growth factor begin to accumulate in the damaged areas. On day 2 of the wound, there is a slight increase in the expression of TGF- β 1 and Collagen IV, VEGF is practically not produced, the number of CD68 + macrophages increases. Day 10 was characterized by a progressive increase in the content of transforming growth factor in leukocytes, lymphocytes, fibroblasts, macrophages and collagen type IV in the surrounding wounds. Ten months after injury and surgery, the wound canal was a large area of dense connective tissue with single venous vessels, often without a muscular layer. Transforming growth factor showed pronounced expression in macrophages and vascular endothelium, while VEGF was manifested as a weak positive response in vascular endothelial cells and single macrophages. Type IV collagen remained between the fibers of dense fibrous tissue, which replaced the wound canal, and was also found in the walls of blood vessels, interalveolar membranes, fibroblasts of the adjacent lung parenchyma.

Conclusions. 1. Traumatic disorders in the lung parenchyma in FPI in the first hours after injury are accompanied by the accumulation of CD68 + macrophages, which persist for 10 months after FPI and become the main producers of TGF- β 1 and VEGF.

2. Transforming growth factor TGF- β 1 and vascular-endothelial growth factor VEGF are found in large quantities in macrophages, leukocytes, lymphocytes, fibroblasts and vascular endothelium from the first day of trauma to the lung parenchyma; up to 10 days the expression of TGF- β 1 becomes significant, while VEGF weakly marks capillary endotheliocytes, arterioles, single macrophages. This immunohistochemical picture explains the long healing period of FPI.

3. The content of pathological collagen type IV Collagen IV on the first day of gunshot wound is minimal, increases up to 10 days and is detected in the fields of fibrosis and dystelectasis of the lung parenchyma after 10 months.

4. Determination of IHC expression of CD68, TGF- β 1, VEGF and Collagen IV in the first 10 days after FPI and in the subsequent stages of treatment of the wounded will help to predict the course of combat trauma and adjust the methods of treatment.

Key words: *immunohistochemical studies, lungs, gunshot wound.*