

УДК 616.617-007.63-007.272-08

**С.И. Тертышный, О.В. Спахи, А.Д. Кокоркин**

## **Иммуногистохимическое исследование стенки мочеточника у детей с врожденным мегауретером**

Запорожский государственный медицинский университет, Украина

SOVREMENNAYA PEDIATRIYA.2016.6(78):107-110; doi 10.15574/SP.2016.78.107

**Цель:** провести сравнительный анализ результатов иммуногистохимического исследования интраоперационного материала детей раннего возраста с мегауретером.

**Пациенты и методы.** Наблюдали и лечили 15 детей в возрасте от 3 до 12 месяцев с врожденным мегауретером II–IV степени. Проводили сравнительные иммуногистохимические исследования операционного материала для объективизации степени редукции гладкомышечного компонента в стенке мочеточника в зависимости от выраженности нейромышечной дисплазии. Использовали моноклональные антитела к цитоплазматическому антигену актину, который экспрессируется на гладкомышечных клетках.

**Результаты.** Выявлены характерные структурные изменения и их статистически достоверные отличия, которые характеризуют слабо выраженную, умеренную и тяжелую степень нейромышечной дисплазии, выявляемую в стенке мочеточника у детей с мегауретером. При слабо выраженной дисплазии площадь  $\alpha$ -SMA положительных клеток в стенке мочеточника составляла 54,19%, при умеренно выраженной дисплазии – 43,43%, при тяжелой – 29,61%. Патоморфологические изменения в мышечном слое мочеточника обратно пропорциональны дистрофическим и дегенеративным изменениям покровного переходного эпителия, что в совокупности определяет моторную дисфункцию мочеточников и способствует развитию вторичной почечной патологии, диктует необходимость проведения хирургической коррекции порока в ближайшие сроки наблюдений.

**Выводы.** Данное исследование подчеркивает важность учета показателей иммуногистохимии при прогнозировании исхода хирургического лечения и сроков его проведения у детей раннего возраста с врожденным мегауретером.

**Ключевые слова:** иммуногистохимия, мегауретер, дети.

### **Введение**

Мегауретер является одним из наиболее тяжелых пороков мочевыделительной системы. Частота этой патологии в последние годы остается высокой и, по данным популяционных исследований, составляет от 10 до 20% в общей структуре пороков мочевого тракта у детей.

Особенности клинического течения данного заболевания у детей раннего возраста, возникающие трудности в определении варианта порока мочевых путей определяют актуальность данной проблемы [1–3,5]. Также актуальным является вопрос о стратегии лечения врожденного мегауретера у детей первых трех лет жизни, критериях выбора методов лечения и оценке их отдаленных результатов [2]. В клинической практике перед хирургами всегда встает вопрос: почему при одном и том же виде врожденных уropатий наблюдаются разные исходы заболевания? Почему у одних детей функция почек сравнительно быстро восстанавливается после проведенного хирургического лечения, а у других, несмотря на качественно проведенную с технической точки зрения операцию, процесс продолжает прогрессивно ухудшаться, вплоть до развития хронической почечной недостаточности [3]?

Экспериментальными и клиническими исследованиями последних лет доказана роль биологически активных соединений в непрерывном прогрессировании врожденных уropатий у детей раннего возраста. К ним, прежде всего, относятся цитокины, факторы роста, ингибирующие ферменты и соединения, которые приводят к хронизации воспаления и формированию дегенеративно-деструктивных изменений мочевого тракта. Традиционно наиболее заметна роль биологических методов в изучении состояния структур мочевого тракта. Современные методы тканевой диагностики успешно дополняются иммуногистохимическими (ИГХ) исследованиями. Комплекс сведений о гистопатологии и гистохимии вро-

жденного порока не является решающим в выборе сроков проведения операции, но позволяет прогнозировать последствия ее несвоевременного выполнения.

**Цель** работы: провести сравнительный анализ результатов иммуногистохимического исследования интраоперационного материала детей раннего возраста с мегауретером.

### **Материал и методы исследования**

Наблюдали и лечили 15 детей в возрасте от 3 до 12 месяцев с врожденным мегауретером II–IV степени. Исследовали интраоперационный материал (участки резецированного мочеточника). Для проведения патогистологического и иммуногистохимического исследования участки мочеточника фиксировали в нейтральном забуференном 10% формалине. После соответствующей обработки ткани заливали парафином и приготавливали серийные срезы толщиной 4 мкм. Иммуногистохимическое исследование проводили для объективизации степени редукции гладкомышечного компонента в стенке мочеточника в зависимости от выраженности нейромышечной дисплазии. Исследование проводили в соответствии со стандартизованными протоколами с использованием моноклональных антител к цитоплазматическому антигену актину  $\alpha$ SMA Mo a-Hu (Alpha Smooth Muscle Actin), Clone 1A4 (DAKO, Дания), который экспрессируется на гладкомышечных клетках. Для детекции использовали пероксидазную систему Poly Vue™ с ДАБ хромогеном. Иммуногистохимическое исследование проведено на базе консультативного патологоанатомического отделения по иммуногистохимической и молекулярно-генетической диагностике опухолей Запорожского областного патологоанатомического бюро (Лицензия АВ №386691 МОЗ Украины, 2007). Оценка площади экспрессии  $\alpha$ -SMA положительных клеток проводилась в 10 полях зрения при увеличении  $\times 200$

с использованием медицинской программы анализа и обработки цифровых изображений ImageJ, предложенной W. Rasband.

Площадь экспрессии представляла собой процентное соотношение числа пикселей цифрового изображения зон экспрессии к общему количеству пикселей в изображении. Для сравнения площади экспрессии  $\alpha$ -SMA положительных клеток в трех условно выделенных группах наблюдений нами были использованы непараметрические методы статистического анализа, в связи с тем, что количество исследуемых случаев в каждой группе составляло 5 ( $n=5$ ), объем выборки составил 15 случаев ( $n=15$ ). Для определения достоверности различий площади  $\alpha$ -SMA положительных клеток в 3-х группах был использован непараметрический ранговый критерий Н Краскела—Уоллеса. При обнаружении достоверной разницы по этому критерию использовали критерий U Мана—Уитни для сравнения двух независимых групп. Результаты считали достоверными при  $p < 0,05$ . Статистическую обработку полученных результатов исследований проводили на персональном компьютере в программе STATISTICA® for Windows 6.0 (StatSoft Inc., лицензия № AXXR712D833214FAN5).

### Результаты исследований и их обсуждение

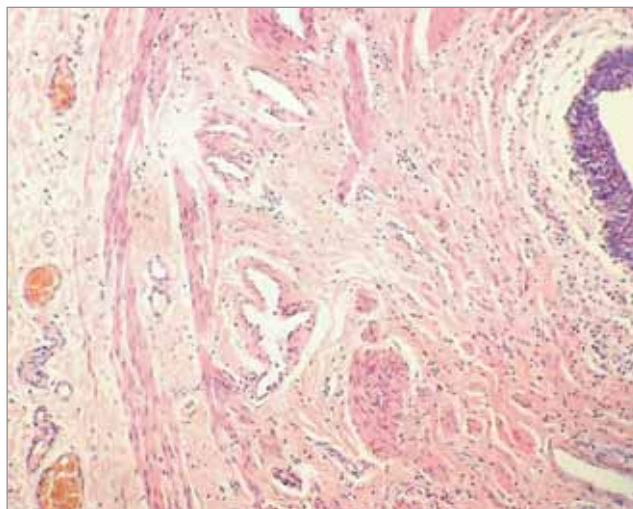
Развитие мегауретера сопровождалось нарушениями гистоархитектоники. Неоднородность строения подслизистого слоя соответствовала разной степени выраженности нейромышечной дисплазии. Наиболее часто наблюдалось уменьшение количества мышечной ткани и увеличение степени фиброзирования в стенках мочеточника. Различная степень выраженности этих процессов позволила выделить три группы наблюдений: со слабо выраженными, умеренно и резко выраженными проявлениями нейромышечной дисплазии.

Слабо выраженные процессы дисплазии сопровождалась уплощением поверхности слизистой оболочки, при этом толщина эпителиального пласта снижалась незначительно.

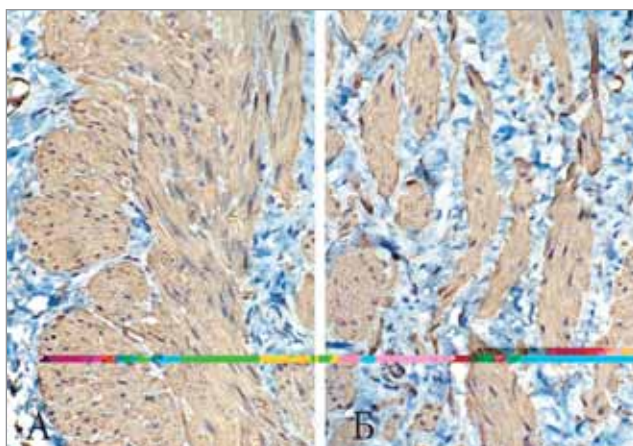
Морфологические изменения слизистого слоя, как при слабо выраженной, так и при умеренно выраженной дисплазии, свидетельствовали о сочетании регенераторных изменений и дистрофических процессов. Структура подслизистого слоя при слабой степени нейромышечной дисплазии отличалась его равномерным расширением с чередованием участков как рыхлой, так и плотной соединительной ткани. Во всех наблюдениях отмечалось увеличение числа клеток за счет незначительного или умеренного накопления в подслизистом слое лимфоцитов и плазматических клеток. Усиление воспаления сопровождалось развитием воспалительной гиперемии с диффузным накоплением гематогенных макрофагов по всему периметру подслизистого слоя. При этом воспалительный инфильтрат изолировал отдельные мышечные слои и пучки мышечных волокон, а в стенке мочеточника регистрировались отечные изменения и мелкие геморагии.

В исходе воспалительных изменений развивался фиброз подслизистого и частично мышечного слоя мочеточника, что значительно отягощало существующие изменения, связанные с нейромышечной дисплазией, и способствовало прогрессированию функциональных расстройств мочевого тракта.

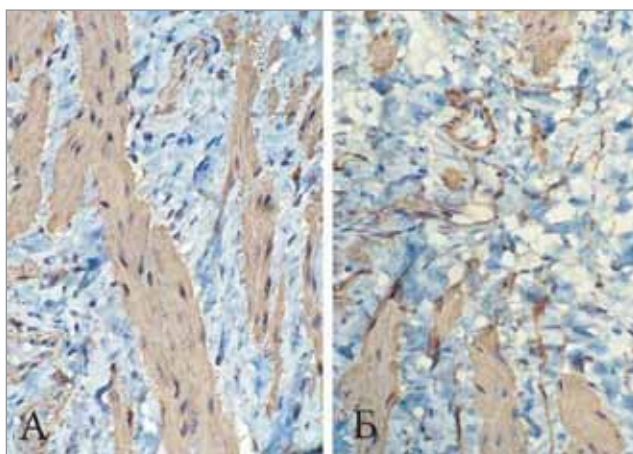
Умеренно выраженные явления нейромышечной дисплазии проявлялись более значительной редукцией мышечного компонента стенки мочеточника. Такие изменения сочетались с выраженными дистрофическими и дегенеративными процессами в слизистой оболочке



**Рис. 1.** Нарушение гистоархитектоники с явлениями субтотального фиброза в стенке мочеточника при тяжелой нейромышечной дисплазии. Отмечаются участки разволокнения продольно и поперечно расположенных мышечных волокон с участками дегенерации. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 200$



**Рис. 2.** А — мышечный слой мочеточника при слабо выраженной дисплазии. Б — мышечный слой мочеточника при умеренно выраженной дисплазии; фрагментация мышечного слоя за счет фиброза. ИГХ к  $\alpha$ -SMA. Увеличение  $\times 600$



**Рис. 2.** А — мышечный слой мочеточника при умеренно выраженной дисплазии. Б — мышечный слой мочеточника при тяжелой дисплазии; сегментарное исчезновение мышечного слоя. ИГХ к  $\alpha$ -SMA. Увеличение  $\times 600$

и в подслизистом слое. Эпителиальный покров имел разную толщину, в эпителии повсеместно отмечались явления белковой и гидрической дистрофии, отдельные клетки разрушались путем апоптоза. В подслизистом слое повсеместно встречались участки лимфо-плазмоцитарной инфильтрации, наблюдалось наличие макрофагов, фибробластов. В проекции выраженных воспалительных изменений отмечалась десквамация эпителия слизистой оболочки. Толщина мышечного слоя была незначительно уменьшена в сравнении с предыдущими наблюдениями, однако разница была не достоверна. Толщина стенки мочеоточника была увеличена, мышечный слой был представлен множественными мышечными волокнами и группами волокон, разделенных прослойками соединительной ткани (разволокнение).

Выраженная нейромышечная дисплазия характеризовалась значительной деформацией стенки мочеоточника за счет неравномерного соотношения гладкомышечного компонента и фиброзной ткани в разных участках. Преобладала фиброзная ткань со значительным содержанием коллагеновых волокон. Отдельные мышечные слои стенки, как правило, не дифференцировались и были представлены хаотично расположенными группами пучков или тяжей мышечных волокон, которые в виде островков были заключены в фиброзированной строме. В участках с сохранившимся мышечным слоем последний был представлен истонченными пучками волокон, которые имели прерывистый ход по всему периметру стенки мочеоточника. В стенке мочеоточника также выявлялись расширенные сосуды со склерозированными стенками, мелкие лимфоцитарные инфильтраты. Основная масса стенки мочеоточника была представлена соединительной тканью (рис. 1).

Выраженность диспластических изменений с уменьшением гладкомышечного компонента в стенке мочеоточника наглядно подтверждается данными иммуногистохимического исследования с использованием моноклональных антител к цитоплазматическому антигену — актину  $\alpha$ SMA (рис. 2–3). С помощью критерия Н Краскела—Уоллеса было установлено, что площадь  $\alpha$ -SMA положительных клеток достоверно отличается в трех группах ( $p=0,011$ ). С использованием критерия U Манна—Уитни было определено, что в группе наблюдений со слабой степенью нейромышечной дисплазии площадь  $\alpha$ -SMA положительных клеток составляла 54,19% (47,37; 56,41) и достоверно превышала площадь  $\alpha$ -SMA положительных клеток в группе с тяжелой степенью дисплазии — 29,61% соответственно (25,49; 33,48), при этом критерий Манна—Уитни составил значение  $U=0,001$ ,  $p=0,014$ .

В группе умеренно выраженной дисплазии площадь  $\alpha$ -SMA положительных клеток составила 43,43% (38,34; 52,99) и также была достоверно выше, чем в группе с тяжелой степенью дисплазии ( $U=1,000$ ,  $p=0,016$ ). Между группами со слабо выраженной и умеренной степенью дисплазии достоверной разницы площади  $\alpha$ -SMA положительных клеток не установлено ( $U=5,000$ ,  $p=0,221$ ).

## Выводы

По нашему мнению, в основе стойкой дилатации мочевых путей лежит процесс постоянного замещения мышечного слоя фиброзной тканью, вплоть до его полной деградации. Выделенная нами степень слабо выраженной нейромышечной дисплазии отличается наличием достаточно развитого мышечного слоя с мало заметными явлениями рубцовой деформации. Подобная степень дисплазии присуща случаям с возможным спонтанным разрешением порока. Выделенная степень умеренной нейромышечной дисплазии является, по сути, переходным состоянием между необратимыми дегенеративными изменениями стенок мочеоточника и состоянием с возможной регрессией дилатации мочевых путей, при условии своевременно выполненного хирургического вмешательства. По нашему мнению, такая степень дисплазии является прямым показанием к хирургическому вмешательству, несмотря на кажущуюся возможность спонтанного излечения. Доказательством этому является наличие явной фиброзной деформации мышечного слоя с лимфоцитарной инфильтрацией перифокальной зоны по типу «флегмонозного воспаления». В таких случаях целесообразно своевременное вмешательство с декомпрессией мочевых путей и последующей ступенчатой антибактериальной и нейростимулирующей терапией.

Тяжелая степень нейромышечной дисплазии представляет собой законченный процесс формирования фиброзного остова мочеоточника с полным или частичным замещением его мышечного слоя. Подобное состояние является необратимым процессом и не оставляет надежды на возможное спонтанное излечение. Удел таких пациентов — это многоэтапные реконструктивные вмешательства с обязательной предварительной декомпрессией мочевых путей.

На основании проведенного исследования мы пришли к выводу, что пациентов с обструктивным мегауретером отличает относительная сохранность мышечного слоя с явлениями слабо и умеренно выраженной дисплазии. По всей видимости, процесс непрерывного замещения поврежденных мышечных клеток фиброзной тканью является главным механизмом формирования стойкой дилатации мочевых путей [6,7]. Так, В.Р. Lee и соавт. (1992) по материалам ИГХ исследований определили соотношение вновь образованного коллагена к гладкомышечным клеткам мочеоточника при обструктивном мегауретере у детей. Было обнаружено, что соотношение коллаген/гладкая мускулатура является наиболее высоким у пациентов с обструктивным мегауретером и составляет значение  $2,0 \pm 0,5$ , при этом в контрольной группе значение не превышает  $0,52 \pm 0,1$  [4].

Таким образом, проведенное нами исследование подчеркивает важность учета показателей гистоморфологии и иммуногистохимии при прогнозировании исхода хирургического лечения и сроков его проведения у детей раннего возраста с врожденным мегауретером.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Айнакулов А. Д. Дифференцированный подход к лечению первичного обструктивного мегауретера у детей / А. Д. Айнакулов, Б. М. Майлыбаев // Детская хирургия. — 2014. — № 5. — С. 16—18.
2. Довлатян А. А. Оперативное лечение нервно-мышечной дисплазии мочеточника / А. А. Довлатян // Урология. — 2005. — № 3. — С. 38—43.
3. Леонова Л. В. Патологическая анатомия врожденных обструктивных уретеритов у детей : автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Л. В. Леонова. — Москва, 2009. — 40 с.
4. A quantitative histological analysis of the dilated ureter of childhood / Lee B. R., Partin A. W., Epstein J. I. [et al.] // J. Urol. — 1992. — Vol. 148 (5). — P. 1482—1486.
5. Decreased interstitial cells of Cajal-like cells, possible cause of congenital refluxing megaureters: Histopathologic differences in refluxing and obstructive megaureters / Kang H. J., Lee H. Y., Jin M. H. [et al.] // Urology. — 2009. — Vol. 74 (2). — P. 318—323.
6. Myocyte apoptosis in primary obstructive megaureters: the role of decreased vascular and neural supply / Payabvash S., Kajbafzadeh A. M., Tavangar S. M. [et al.] // J. Urol. — 2007. — Vol. 178 (1). — P. 259—264.
7. Rasband W. S. Image J., U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA [Electronic resource]. — URL : <http://imagej.nih.gov/ij/>. — Title from screen.

### Імуногістохімічне дослідження стінки сечовода у дітей з природженим мегауретером

*С.І. Тертишний, О.В. Спахі, О.Д. Кокоркін*

Запорізький державний медичний університет, Україна

**Мета:** провести порівняльний аналіз результатів імуногістохімічного дослідження інтраопераційного матеріалу дітей раннього віку з мегауретером.

**Пацієнти і методи.** Спостерігали і лікували 15 дітей віком від 3 до 12 місяців із вродженим мегауретером II–IV ступеня. Проводили порівняльні імуногістохімічні дослідження операційного матеріалу для об'єктивізації ступеня редукції гладком'язового компонента в стінці сечовода залежно від виразності нейро'язової дисплазії. Використовували моноклональні антитіла до цитоплазматичного антигену актину, який експресується на клітинах гладких м'язів.

**Результати.** Виявлено характерні структурні зміни та їх статистично достовірні відмінності, які характеризують слабо виражену, помірну і важку нейро'язову дисплазію, що реєструються в стінці сечовода у дітей з мегауретером. При слабо вираженій дисплазії площа  $\alpha$ -SMA позитивних клітин у стінці сечовода становила 54,19%, при помірній дисплазії — 43,43%, при важкій — 29,61%. Патоморфологічні зміни в м'язовому шарі сечовода обернено пропорційні до дистрофічних та дегенеративних змін покривного перехідного епітелію, що в сукупності визначає моторну дисфункцію сечоводів і сприяє розвитку вторинної ниркової патології, диктує необхідність проведення хірургічної корекції вади у найближчі терміни спостереження.

**Висновки.** Дане дослідження підкреслює важливість урахування показників імуногістохімії при прогнозуванні результату хірургічного лікування і термінів його проведення у дітей раннього віку з мегауретером.

**Ключові слова:** імуногістохімія, мегауретер, діти.

### Immunohistochemical research of wall of ureter for children with congenital megaurete

*S. Tertyshnyy, O. Spahy, A. Kokorkin*

Zaporozhye State Medical University, Ukraine

Congenital megaureter is one of the most serious defects of the urinary system. The frequency of this disease remains high and population studies of the data from 10 to 20% in the overall structure malformations of the urinary tract in children in recent years.

**Objective:** To conduct a comparative analysis of the results of immunohistochemical study of intraoperative material infants with megaureter

**Materials and methods:** observed and treated 15 children aged 3 to 12 months with congenital megaureter II–IV degree. We conduct a comparative immunohistochemical study of operational material objectification degree of reduction smooth muscle component in the wall of the ureter, depending on the severity of the neuro-muscular dysplasia. Used monoclonal antibodies to cytoplasmic actin antigen expressed on smooth muscle cells.

**Results and discussion:** the characteristic structure changes and statistically significant differences that characterize the poorly expressed, moderate and severe neuromuscular dysplasia recorded in the wall of the ureter in children with megaureter. In mild dysplasia area of  $\alpha$ -SMA positive cells was 54.19% in the wall of the ureter, with moderate dysplasia — 43.43%, while heavy — 29.61%. Pathological changes in the muscular layer of the ureter are inversely proportional to dystrophic and degenerative changes of the cover transitional epithelium, which together determine the motor dysfunction of the ureters and promotes the development of secondary renal disease, dictates the need for surgical correction of the defect as soon as possible observations.

**Conclusion:** Our study emphasizes the importance of taking into account indicators of immunohistochemistry in predicting the outcome of surgical treatment and its timing in infants with congenital megaureter.

**Keywords:** immunohistochemistry, megaureter children.

## Сведения об авторах:

**Тертишний С.И.** — д.мед.н., проф. каф. патологической анатомии и судебной медицины с основами права ЗГМУ. Адрес: г. Запорожье, пр. Ленина, 70.

**Спахи Олег Владимирович** — д.мед.н., проф., зав. каф. детской хирургии и анестезиологии Запорожского государственного медицинского университета.

Адрес: г. Запорожье, пр. Ленина, 70.

**Кокоркин Алексей Дмитриевич** — ассистент каф. детской хирургии и анестезиологии Запорожского государственного медицинского университета.

Адрес: г. Запорожье, пр. Ленина, 70; тел. (+38 061) 764-35-71

Статья поступила в редакцию 06.09.2016 г.