



В. В. Грубник¹, Т. О. Савенко²

¹ Одеський національний медичний університет

² Одеське обласне патологоанатомічне бюро

ВИВЧЕННЯ СКЛАДУ КОЛАГЕНУ I ТА III ТИПУ В СТРАВОХІДНО-ШЛУНКОВОМУ ПЕРЕХОДІ У ХВОРИХ З ГРИЖАМИ СТРАВОХІДНОГО ОТВОРУ ДІАФРАГМИ

Мета роботи — вивчити склад колагену I і III типу в зразках діафрагмово-стравохідних зв'язок у пацієнтів з грижами стравохідного отвору діафрагми та без них.

Матеріали і методи. Досліджено склад колагену I та III типу в зразках діафрагмово-стравохідних зв'язок у 18 пацієнтів з гастроєзофагеальною рефлюксною хворобою, прооперованих з приводу грижі стравохідного отвору діафрагми. Всім пацієнтам інтраопераційно виконано біопсію (основна група) діафрагмово-стравохідних зв'язок. Для порівняння зразки діафрагмово-стравохідних зв'язок були відібрані у 14 трупів (група порівняння). В основній групі було 8 (44,4%) чоловіків і 10 (55,6%) жінок, у групі порівняння — відповідно 6 (42,9%) та 8 (57,1%) ($p > 0,05$). Середній вік у групах становив відповідно $(49,0 \pm 15,4)$ і $(49,3 \pm 9,6)$ року ($p > 0,05$). Індекс маси тіла суттєво не відрізнявся в групах ($p > 0,05$). З дослідження вилучали пацієнтів із захворюваннями, пов'язаними із синтезом колагену, курців та осіб, котрі раніше перенесли операцію у ділянці шлунково-стравохідного переходу. Кількість I та III типу колагену визначали з використанням первинних моноклональних антитіл до відповідних білків. Для кількісної оцінки результатів імуногістохімічних реакцій у зрізах при 400-разовому збільшенні мікроскопа підраховували число клітин з імунопероксидазною міткою (позитивне забарвлення) у 10 полях зору, обраних випадковим чином (> 200 клітин). Підрахунок отриманих результатів проводили по формулі H-SCORE.

Результати та обговорення. Вміст колагену I та III типу в діафрагмово-стравохідних зв'язках у хворих з грижами стравохідного отвору діафрагми був відповідно на 49,1 та 29,3% нижчий, ніж у групі порівняння ($p < 0,01$).

Висновки. У хворих з великими і гігантськими грижами має місце дефект синтезу сполучної тканини. Якісний склад колагену діафрагмово-стравохідних зв'язок може бути етіологічним чинником виникнення гриж стравохідного отвору діафрагми. Це слід урахувати при виборі методики лапароскопічної крурорафії.

Ключові слова: гастроєзофагеальна рефлюксна хвороба, грижі стравохідного отвору діафрагми, колаген, діафрагмово-стравохідна зв'язка.

Гастроєзофагеальна рефлюксна хвороба (ГЕРХ) є захворюванням XXI століття. Поширеність ГЕРХ у високорозвинених країнах становить 15—20% [1, 7]. Основою патогенезу ГЕРХ є порушення функціонування антирефлюксного механізму стравохідно-шлункового переходу (СШП) і перистальтики стравоходу. Складовими антирефлюксного бар'єра є нижній стравохідний сфінктер (НСС), ніжки діафрагми та діафрагмово-стравохідна зв'язка (ДСЗ) [1, 7]. Найчастішою причиною порушення антирефлюксного механізму є грижа стравохідного отвору діафрагми (ГСОД), яку виявляють у 85—90% хворих на ГЕРХ [7, 13]. У функціональному плані зону високого тиску в ділянці

СШП створюють два компоненти — внутрішній (гладенька мускулатура стравоходу та шлунка) і зовнішній (ніжки діафрагми). Обидва компоненти є взаємодоповнювальними та об'єднані в єдине ціле ДСЗ. Останні стабілізують СШП і не дають йому мігрувати у грудну клітку.

Останнім часом опубліковані зарубіжні дослідження, в яких виявлено зміни сполучної тканини, а саме зниження кількості та якості колагену в ДСЗ у хворих з ГСОД [4, 14]. Ці роботи показують, що в етіології ГСОД відіграють важливу роль біологічні зміни в структурах СШП, такі як ніжки діафрагми та стабілізуювальний апарат (шлункова-печінкова зв'язка, шлункова-діафрагмальна зв'язка, ДСЗ), а не

лише механічний стрес, якому піддається СШП. В інших роботах не підтверджено взаємозв'язок між складом колагену в зв'язках СШП і розвитку ГСОД [3]. Особливостей складу сполучної тканини у пацієнтів з ГСОД остаточно не вивчено, хоча вони мають важливе значення при визначенні клінічного та оперативного підходу до лікування таких хворих.

Мета роботи — вивчити склад колагену I та III типу в зразках діафрагмово-стравохідних зв'язок у пацієнтів з грижами стравохідного отвору діафрагми та без них.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Досліджено склад колагену в ДСЗ у 18 пацієнтів з ГЕРХ та ГСОД, яким було виконано лапароскопічну крурорафію та фундоплікацію в Одеській обласній клінічній лікарні. Всі пацієнти погодилися на участь у дослідженні та підписали форму інформованої згоди. Групу порівняння утворено з 14 трупів з Одеського обласного патологоанатомічного бюро до 10 год після смерті, з формою інформованої згоди на проведення лікувальних та діагностичних процедур, підписаною прижиттєво пацієнтом або членом сім'ї. Відсутність ГСОД у трупах визначали під час візуального дослідження стравохідного отвору. Критерії залучення пацієнтів і трупів: вік від 20 до 80 років, індекс маси тіла до 35,0 кг/м². Пацієнтів із захворюваннями, пов'язаними із синтезом колагену (ревматоїдний артрит, ювенільний ревматоїдний артрит, системний червоний вовчак, склеродермія, дерматоміозит та поліміозит, некротизувальний васкуліт, синдром Шегрена, хвороба змішаної сполучної тканини, синдром Марфана, синдром Данфелеса тощо), курців та осіб, котрі раніше перенесли операцію на ділянці стравоходу, не залучали у дослідження.

Наявність ГСОД у всіх пацієнтів діагностували за результатами ендоскопічного дослідження та рентгенографії стравоходу і шлунка. Під час оперативних втручань розраховували площу гризових воріт за формулою F. A. Granderath і співавт. [8]. Метод визначення площі поверхні стравохідного отвору діафрагми (ППСОД) ґрунтується на вимірюванні поперечного та поздовжнього (вертикального) розміру стравохідного отвору після повної мобілізації його країв і розрахунку показника за формулою [8]:

$$\text{ППСОД} = 2 \cdot \text{ВР} \cdot \arcsin \frac{\text{ПР}}{2 \cdot \text{ВР}},$$

де ВР — вертикальний, ПР — поперечний розміри.

У дослідження залучено хворих з площею ГСОД від 10 до 30 см², що відповідно до нашої класифікації є великими та гігантськими [9]. Під час операції і дисекції в ділянці СШП вилучали зразок передньої ДСЗ розміром 1 × 1 см, після чого операцію виконували за стандартною методикою.

Групу порівняння відібрали під час інспекцій патологоанатомічного бюро, де трупи, які відповідали критеріям залучення, були ідентифіковані

протягом 10 год після смерті. З передньої ділянки стравоходу відбирали зразки ДСЗ розміром 1 × 1 см, які зберігали у 10 % нейтральному розчині формаліну на фосфатному буфері.

Гістологічний метод. Зразки ДСЗ фіксували у 10 % нейтральному розчині формаліну на фосфатному буфері протягом 24 год. Фіксацію, заливку в парафін і приготування здійснювали протягом 24 год за загальноприйнятою методикою (Е. Пірс, 1962; Р. Лілі, 1969; Д. С. Саркісов, 1996). З кожного блоку готували 10—12 зрізів, які поміщали на скло, оброблене полі-L-лізином (Novocastra, Велика Британія) для підвищення адгезивних властивостей парафінових зрізів. Зрізи фарбували гематоксиліном та еозином. Перегляд і фотографування мікропрепаратів здійснювали на фотомікроскопі (Carl Zeiss Primostar, Німеччина).

Гістологічне дослідження виконували для визначення морфологічних особливостей будови тканин зв'язкового апарату СШП.

Імуногістохімічне дослідження проводили на серійних парафінових зрізах біопсійного матеріалу зв'язкового апарату СШП. Принцип методу ґрунтується на виявленні білків колагену I та III типу в клітинах сполучної тканини СШП за допомогою первинних моноклональних антитіл до відповідних білків (антитіла кролика до колагену людини I типу (RAN C11-0,1) серія 1210-20 і антитіла кролика до колагену людини III типу (RAN C33) серія 1404-03).

Морфометричний метод. Для кількісної оцінки результатів імуногістохімічних реакцій у зрізах при 400-разовому збільшенні мікроскопа підраховували кількість клітин з імунопероксидазною міткою (позитивне забарвлення) у 10 полях зору, обраних випадковим чином (> 200 клітин) (М. Ю. Зак, 2011). Підрахунок отриманих результатів проводили по формулі H-SCORE.

Статистична обробка результатів. Статистична обробка виконано методами дисперсійного та кореляційного аналізу із застосуванням функцій пакетів MS Excel (Microsoft Inc., США) та Statistica (StatSoft Inc). При порівнянні основної та контрольної груп за нульову приймали гіпотезу про відсутність значущої різниці між відповідними параметрами. Результати наведено у таблиці.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Усі оперативні втручання в основній групі виконано лапароскопічно. Конверсій, тяжких інтраопераційних і післяопераційних ускладнень не спостерігали. Ускладнень, пов'язаних з біопсією ДСЗ, не було. Пацієнтам виконано лапароскопічну фундоплікацію за Ніссеном та лапароскопічну крурорафію. У хворих з гігантськими грижами шви крурорафії зміцнювали сітчастими імплантатами. У деяких хворих з рецидивом ГСОД прведено фундоплікацію за Тупе.

Імуногістохімічний аналіз зразків в основній групі та у групі порівняння виконано одноразово

Т а б л и ц я
Демографічні характеристики та середні рівні колагену

Показник	Основна група	Група порівняння	P
Чоловіки	8 (44,4%)	6 (42,9%)	> 0,05 ^Ф
Жінки	10 (55,6%)	8 (57,1%)	
Вік, роки	49,0 ± 15,4	49,3 ± 9,6	> 0,05 ^{С, М}
Індекс маси тіла, кг/м ²	25,7 ± 4,3	25,1 ± 4,2	> 0,05 ^{С, М}
Колаген I типу, кл.*	137,8 (57,5)	270,7 (17,5)	< 0,01 ^М
Колаген III типу, кл.*	212,2 (92,5)	300 (0)	< 0,01 ^М

^Ф Точний тест Фішера; ^С t-критерій Стьюдента;

^М критерій Манна—Уїтні.

* Експресія клітин в 10 довільних полях зору при 400-кратному збільшенні (в дужках наведено міжквартильний розмах).

після отримання достатньої кількості матеріалу та в однакових умовах для дотримання точності експерименту.

Згідно з отриманими результатами, у пацієнтів з ГСОД мало місце суттєве ($p < 0,01$) зниження вмісту колагену I та III типу в ділянці СШП (див.

таблицю). Середній вік, співвідношення статей, середній індекс маси тіла суттєво не відрізнялися в досліджуваних групах (див. таблицю). Не виявлено суттєвих відмінностей за вмістом колагену між чоловіками та жінками, а також залежності вмісту колагену в сполучній тканині від віку пацієнтів.

Всупереч нашим очікуванням, дефіцит вмісту колагену I типу в зв'язках СШП у хворих з ГСОД був більшим на відміну від колагену III типу. Так, вміст колагену I типу в ДСЗ був нижчим на 49,1% (рис. 1), ніж у групі порівняння, а колагену III типу — на 29,3% ($p < 0,01$; рис. 2).

У літературі є багато праць, в яких зазначено наявність взаємозв'язку між дефектами синтезу колагену і виникненням прямих та непрямих пахових гриж і гриж черевної стінки [6]. Чи є дефект синтезу колагену причиною виникнення ГСОД не зрозуміло [6, 15].

Періезофагеальні зв'язки характеризуються великими еластичними волокнами. За даними J. A. Surci та співавт. [4], наявність ГЕРХ та ГСОД пов'язана з ослабленням еластичних волокон у двох з трьох зв'язок, які підтримують СШП.

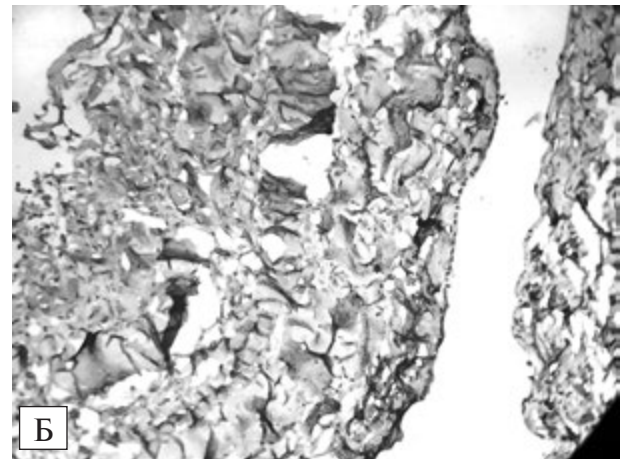
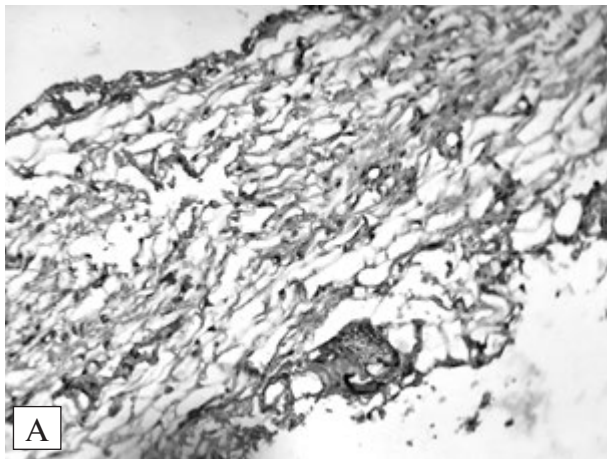


Рис. 1. Колаген I типу в основній групі (А) та у групі порівняння (Б). Імуногістохімія × 20

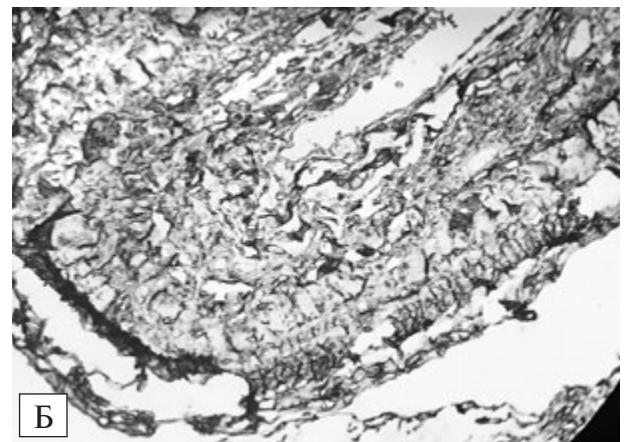
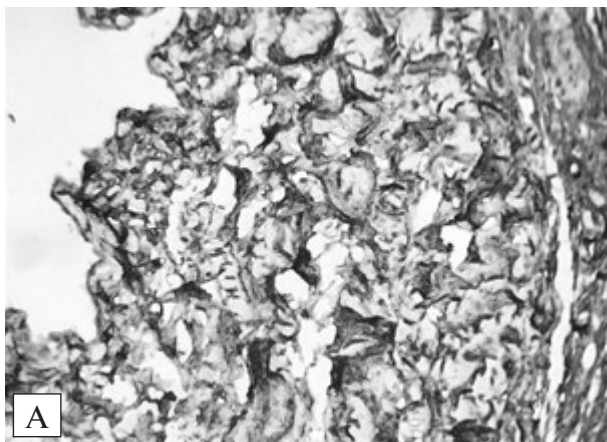


Рис. 2. Колаген III типу в основній групі (А) та у групі порівняння (Б). Імуногістохімія × 20

Зменшення вмісту еластину та колагену в еластичних волокнах періезофагеальних зв'язок лежить в основі розвитку ГСОД. У 2009 р. В. Asling та співавт. [2] виявили кореляцію між утворенням ГСОД та наявністю гена COL3A1 у хромосомі 2, котрий кодує колаген типу III. Цей ген був більше поширений у сім'ях, члени яких мали GERX і хітальні грижі [2]. Таким чином, нещодавні дослідження встановили зв'язок між частотою рецидивів після лапароскопічних антирефлюксних операцій та дефіцитом колагену I і особливо III типу в зв'язках стравоходу [2, 4, 14].

Наші дані свідчать, що структура ДСЗ у пацієнтів з GERX і ГСОД була слабшою і, ймовірно, мала меншу стійкість до сил розтягування СШП, ніж у ДСЗ трупів без ГСОД. Ці дані дають підставу припустити, що якість ДСЗ та їх здатність підтримувати і стабілізувати СШП нижче за діафрагму може бути одним з етіологічних чинників виникнення ГСОД і, можливо, розвитку GERX.

Через використання різних методів визначення колагену і різні характеристики груп суб'єктів дані про кількість та якість колагену сильно відрізняються [3, 14]. Ми провели дослідження, використовуючи модифіковану методику [14]. У нашому дослідженні на відміну від зарубіжних робіт вдалося підібрати однорідні групи хворих, які суттєво не відрізнялися за співвідношенням статей, середнім віком, індексом маси тіла і не мали расових відмінностей, що може впливати на отримані результати.

Ми порівнювали вміст колагену в ДСЗ у хворих з ГСОД з аналогічним показником у трупів без ГСОД. Використовували біопсійний матеріал

Конфлікту інтересів немає.

Участь авторів: концепція і дизайн дослідження, статистичне опрацювання даних, написання тексту — В. Г.; збір матеріалу, редагування — В. Г., Т. С.; обробка матеріалу — Т. С.

(основна група) та зразки автопсійного матеріалу (група порівняння). Численні дослідження підтверджують доцільність використання зразків розтину для порівняння досліджуваного матеріалу в хворих з різною патологією [5, 12]. Є дані, що багато білків розкладаються повільніше, ніж вважалося раніше [5, 12]. J. Maleszewski та співавт. [11] опублікували результати дослідження, згідно з якими деякі білки, зокрема сполучної тканини, зберігають імуногістохімічні характеристики протягом як мінімум 24 год у відмерлих тканинах.

Наші результати свідчать про те, що виникнення рецидиву ГСОД залежить не лише від хірургічної техніки та досвіду хірургів, а й від біологічної якості тканин у ділянці СШП. Отримано дані про те, що GERX та ГСОД розвиваються у хворих зі слабкістю підтримувальних мембран СШП і порушенням м'язової структури ніжок діафрагми. У цьому контексті вважаємо доцільним використання сітчастих імплантатів для зміцнення швів крурорафії [10].

На нашу думку, необхідно провести дослідження для виявлення оптимальних типів сітчастих імплантатів та методів їх фіксації для лікування ГСОД з метою зниження частоти рецидивів.

ВИСНОВКИ

У хворих з великими і гігантськими грижами має місце дефект синтезу сполучної тканини. Якісний склад колагену діафрагмово-стравохідних зв'язок може бути етіологічним чинником виникнення гриж стравохідного отвору діафрагми. Це слід урахувати при виборі методики лапароскопічної крурорафії.

Література

1. Грубник В. В., Малиновский А. В. Критические аспекты лапароскопической хирургии гастроэзофагеальной рефлюксной болезни и грыж пищеводного отверстия диафрагмы. — Одесса: ВМВ-типография, 2015. — 106 с.
2. Asling B., Jirholt J., Hammond P. et al. Collagen type III alpha I is a gastro-oesophageal reflux disease susceptibility gene and a male risk factor for hiatus hernia // *Gut*. — 2009. — Vol. 58. — P. 1063—1069.
3. Brown S. R., Melman L., Jenkins E. et al. Collagen type I:III ratio of the gastroesophageal junction in patients with paraesophageal hernias // *Surg. Endosc.* — 2011. — Vol. 25. — P. 1390—1394.
4. Curci J. A., Melman L. M., Thompson R. W. et al. Elastic fiber depletion in the supporting ligaments of the gastroesophageal junction: a structural basis for the development of hiatal hernia // *J. Am. Coll. Surg.* — 2008. — Vol. 207, N 2. — P. 191—196.
5. De Paeppe M. E., Mao Q., Huang C. et al. Postmortem/RNA and protein stability in perinatal human lungs // *Diagn. Mol. Pathol.* — 2002. — Vol. 11. — P. 170—176.
6. El Sherif A., Yano F., Mittal S., Filipi C. J. Collagen metabolism and recurrent hiatal hernia: cause and effect? // *Hernia*. — 2006. — Vol. 10. — P. 511—520. <https://doi.org/10.1007/s10029-006-0152-9>.
7. Fuchs K. H., Babic B. et al. EAES recommendations for the management of gastroesophageal reflux disease // *Surg. Endosc.* — 2014. — Vol. 28. — P. 1753—1773.
8. Granderath F. A., Schweiger U. M., Pointner R. Laparoscopic antireflux surgery: Tailoring the hiatal closure to the size of hiatal surface area // *Surg. Endosc.* — 2007. — Vol. 21. — P. 542—548.
9. Grubnik V. V., Malynovskyy A. V. Laparoscopic repair of hiatal hernias: new classification supported by long-term results // *Surg. Endosc.* — 2013. — Vol. 27. — P. 4337—4346.
10. Ilyashenko V. V., Grubnyk V. V., Grubnik V. V. Laparoscopic management of large hiatal hernia: mesh method with the use of ProGrip mesh versus standard crural repair // *Surg. Endosc.* — 2018. — Vol. 32. — P. 3592. <https://doi.org/10.1007/s00464-018-6087-2>.
11. Maleszewski J., Lu J., Fox-Talbot K., Halushka M. K. Robust immunohistochemical staining of several classes of proteins in tissues subjected to autolysis // *J. Histochem. Cytochem.* — 2007. — Vol. 55. — P. 597—606. <https://doi.org/10.1369/jhc.6A7152.2007>.
12. Pelstring R. J., Allred D. C., Esther R. J. et al. Differential antigen preservation during tissue autolysis // *Hum. Pathol.* — 1991. — Vol. 22. — P. 237—241.
13. Stefanidis D., Hope W. W. et al. The SAGES, Committee Guidelines (2010) Guidelines for surgical treatment of gastroesophageal reflux disease // *Surg. Endosc.* — 2010. — Vol. 24. — P. 2647—2669.
14. Von Diemen V., Trindade E. N., Trindade, M. R. M. Hiatal hernia and gastroesophageal reflux: Study of collagen in the phrenoesophageal ligament // *Surg. Endosc.* — 2016. — Vol. 30. — P. 5091.
15. Weber C., Davis C. S., Shankaran V., Fisichella P. M. Hiatal hernias: a review of the pathophysiologic theories and implication for research // *Surg. Endosc.* — 2011. — Vol. 25. — P. 3149—3153.

В. В. Грубник¹, Т. А. Савенко²

¹ Одеський національний медичний університет

² Одеське обласне патологоанатомічне бюро

ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА КОЛЛАГЕНА I И III ТИПА В ПИЩЕВОДНО-ЖЕЛУДОЧНОМ ПЕРЕХОДЕ У БОЛЬНЫХ С ГРЫЖАМИ ПИЩЕВОДНОГО ОТВЕРСТИЯ ДИАФРАГМЫ

Цель работы — изучить состав коллагена I и III типа в образцах диафрагмально-пищеводных связок у пациентов с грыжами пищеводного отверстия диафрагмы и без них.

Материалы и методы. Исследован состав коллагена I и III типа в образцах диафрагмально-пищеводных связок у 18 пациентов с гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью, прооперированных по поводу грыжи пищеводного отверстия диафрагмы. Всем пациентам интраоперационно выполнена биопсия (основная группа) диафрагмально-пищеводных связок. Для сравнения образцы диафрагмально-пищеводных связок были отобраны у 14 трупов (группа сравнения). В основной группе было 8 (44,4 %) мужчин и 10 (55,6 %) женщин, в группе сравнения — соответственно 6 (42,9 %) и 8 (57,1 %) ($p > 0,05$). Средний возраст в группах составлял соответственно $49,0 \pm 15,4$ и $49,3 \pm 9,6$ года ($p > 0,05$). Индекс массы тела существенно не отличался в группах ($p > 0,05$). Из исследования исключили пациентов с заболеваниями, связанными с синтезом коллагена, курильщиков и лиц, которые ранее перенесли операцию в области пищеводно-желудочного перехода. Количество I и III типа коллагена определяли с использованием первичных моноклональных антител к соответствующим белкам. Для количественной оценки результатов иммуногистохимических реакций в срезах при 400-кратном увеличении микроскопа подсчитывали число клеток с иммунопероксидазной меткой (положительная окраска) в 10 полях зрения, выбранных случайным образом (> 200 клеток). Подсчет полученных результатов проводили по формуле H-SCORE.

Результаты и обсуждение. Содержание коллагена I и III типа в диафрагмально-пищеводных связках у больных с грыжами пищеводного отверстия диафрагмы было соответственно на 49,1 и 29,3 % ниже, чем в группе сравнения ($p < 0,01$).

Выводы. У больных с большими и гигантскими грыжами имеет место дефект синтеза соединительной ткани. Количественный состав коллагена диафрагмально-пищеводных связок может быть этиологическим фактором возникновения грыж пищеводного отверстия диафрагмы. Это следует учитывать при выборе методики лапароскопической круорографии.

Ключевые слова: гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь, грыжи пищеводного отверстия диафрагмы, коллаген, диафрагмально-пищеводная связка.

V. V. Grubnyk¹, T. A. Savenko²

¹ Odesa National Medical University

² Odesa Regional Pathoanatomical Bureau

COLLAGEN TYPE I AND III STUDY IN THE GASTROESOPHAGEAL JUNCTION IN THE PATIENTS WITH HIATAL HERNIA

The aim — to study the collagen I and III composition in samples of the phrenoesophageal ligament in patients with and without hiatal hernia.

Materials and methods. The composition of collagen type I and type III was studied in samples of the phrenoesophageal ligament in 18 patients with gastroesophageal reflux disease who underwent hiatal hernia repair. Intraoperative biopsy was performed on all patients (main group). For comparison, samples of the phrenoesophageal ligament were collected from 14 cadavers (control group). In the main group there were 8 (44.4 %) men and 10 (55.6 %) women, in the comparison group — 6 (42.9 %) and 8 (57.1 %), respectively ($p > 0.05$). The average age in the groups was 49.0 ± 15.4 and 49.3 ± 9.6 years, respectively ($p > 0.05$). The body mass index did not significantly differ in the groups ($p > 0.05$). Patients with diseases associated with collagen synthesis, smokers and individuals who had previously undergone an operation in the area of the esophago-gastric ligament were excluded from the study. The amount of type I and III collagen was determined with primary monoclonal antibodies to the corresponding proteins. To quantify the results of immunohistochemical reactions in sections with a 400-fold increase in the microscope, the number of cells in which immunoperoxidase marks (positive staining) are detected in 10 fields of view selected at random (> 200 cells) is detected. The calculation of the results was carried out according to the H-SCORE formula.

Results and discussion. The content of collagen type I and type III in the ligaments in patients with hiatal hernia was 49.1 % and 29.3 %, respectively, lower than in the control group ($p < 0.01$).

Conclusions. Patients with large and giant hernias has a connective tissue synthesis defect. The quality of phrenoesophageal ligament can be an etiological factor for the hiatal hernia occurrence. This factor should be considered when selecting a method of laparoscopic crurography.

Key words: collagen, phrenoesophageal ligament, hiatal hernia, gastroesophageal reflux disease.