



І. А. Криворучко¹,
І. В. Сорокіна¹,
К. Ю. Пархоменко²,
Т. М. Фірсик¹,
О. П. Божко²

¹Харківський національний
медичний університет

²Комунальне некомерційне
підприємство Харківської
обласної ради «Обласна
клінічна лікарня»

© Колектив авторів

РОЛЬ ДЕЯКИХ ПРОЗАПАЛЬНИХ ЦИТОКІНІВ У ФОРМУВАННІ КРІПТОГЛАНДУЛЯРНОЇ АНАЛЬНОЇ ФІСТУЛИ

Резюме. *Вступ.* Сучасні хірургічні підходи до лікування нориць прямої кишки передбачають виконання операцій, які найменше пошкоджують сфінктерний комплекс та полягають у необхідності повного висічення анальної фістули, що часто супроводжується значною кількістю рецидивів в залежності від обраного методу операції. Існує припущення, що невдача пояснюється запаленням, яке триває після хірургічних втручань, а цитокіни відіграють важливу роль при цих процесах.

Мета дослідження — оцінити місцеву продукцію та визначити роль ІЛ-6 та TNF α у формуванні нориць прямої кишки.

Матеріали і методи. Тканину фістульного тракту було отримано у 90 пацієнтів обох статей з транссфінктерною норицею кріптогландулярного походження в період з вересня 2018 року до лютого 2020 року, які перенесли оперативні втручання (фістулотомія, модифікована техніка LIFT, використання методики біозварювання фістульного тракту). У зразках замороженої тканини за допомогою імуногістологічного дослідження кількісно оцінювали наявність ІЛ-6 і TNF- α .

Результати. Частота клітин, що продукують ІЛ-6, була найвищою (32,0 \pm 4,0 екземплярів у полі зору) не тільки в запальному інфільтраті, але й в грануляційній тканині та незрілій сполучній тканині фістульного тракту. Найменші показники клітин-продуцентів ІЛ-6 склали (23,0 \pm 3,0) екземплярів у полі зору. Частота клітин, що продукують рецептори до TNF- α складала від (17,0 \pm 1,0) екземплярів у полі зору до (24,0 \pm 3,0) екземплярів у полі зору.

Висновки. Визначена велика кількість клітин-продуцентів ІЛ-6 та TNF- α вказує на активну роль цих цитокінів у формуванні нориць прямої кишки.

Ключові слова: *транссфінктерні нориці прямої кишки, хірургічне лікування, цитокіни, інтерлейкін-6, фактор некрозу пухлини α , дослідження, результати.*

Вступ

Нориці прямої кишки залишаються одним з найпоширеніших проктологічних захворювань. Така розповсюдженість захворювання пояснюється пізнім зверненням за медичною допомогою та неправильно обраною тактикою хірургічного лікування. За даними літератури, після розкриття гнояка без ліквідації його внутрішнього отвору, майже у 64 % хворих утворюються нориці прямої кишки [1, 2]. Формування фістули прямої кишки залежить від виду бактерій, їх вірулентності з однієї сторони, та стану організму хворого, його імунітету та характеру реакції на запалення — з іншої. У роботах деяких авторів визначено взаємозв'язок деяких цитокінів з механізмами пошкодження запалення слизової оболонки прямої кишки та міграцією умовно-патогенної флори власного мікробіому, індукованої ними,

з подальшим формуванням норицевого ходу [1, 2, 3]. Продовження вивчення патогенезу даного захворювання демонструє активну роль цитокінів у стимуляції процесів колагеногенезу та формуванні нориць у переважній кількості пацієнтів [1, 2, 4, 5]. Тому визначення та ідентифікація цитокінів в анальних фістулах може мати велике значення для подальшої розробки методів лікування.

Мета досліджень

Оцінити місцеву продукцію та визначити роль ІЛ-6 та TNF α у формуванні нориць прямої кишки.

Матеріали та методи досліджень

До дослідження увійшло 90 пацієнтів, яким було встановлено діагноз нориці прямої кишки. Всі пацієнти знаходилися на лікуванні в

хірургічному відділенні КНП ХОР «Обласна клінічна лікарня» м. Харків, в період з вересня 2018 року до лютого 2020 року. Критеріями включення до дослідження були: наявність неускладненої транссфінктерної нориці прямої кишки. Критеріями виключення – нориці, пов'язані з хворобою Крона, наявність нориць після променевої терапії, нориці прямої кишки на фоні специфічної флори (актиномікоз, туберкульоз тощо), декомпенсована супутня серцево-судинна патологія, наявність онкологічних захворювань у анамнезі.

Пацієнтам, яких було включено до дослідження, проведено ряд лабораторних та інструментальних методів дослідження за стандартними методиками. Жоден із пацієнтів не приймав антибіотиків та/або імуномодуючих засобів напередодні оперативного втручання. Для характеристики анальних фістул було створено базу даних, що представлена в табл. 1.

Таблиця 1

Характеристика нориць прямої кишки

Критерії оцінки	Показники
Тип нориці прямої кишки:	транссфінктерна (100%)
Низькі транссфінктерні	64 (71,1%)
Високі транссфінктерні	26 (28,9%)
Локалізація внутрішнього норицевого отвору:	
передня	21 (23,3%)
задня	67 (74,5%)
латеральна	2 (2,2%)
Локалізація зовнішнього норицевого отвору:	
передня	18 (20%)
задня	52 (57,7%)
латеральна	20 (22,3%)
Тривалість захворювання:	
до 3 місяців	11 (12,2%)
від 3 до 6 місяців	46 (51,1%)
більше 12 місяців	33 (36,7%)
Вид хірургічної техніки:	
фістулотомія (стандартна)	30 (33,3%)
модифікована техніка LIFT	30 (33,3%)
біозварювання фістульного тракту	30 (33,3%)

Матеріал для морфологічного дослідження представлений тканинами анальної нориці, що був отриманий у ході операцій. Усі пацієнти були розділені на три групи, що відрізнялися методом висічення анальної фістули. До першої групи включено 30 пацієнтів, яким виконувалося висічення нориці за стандартною методикою. До другої групи увійшло 30 пацієнтів, яким було виконано висічення нориці за модифікованою технікою LIFT [6, 7, 8], до третьої групи було включено 30 пацієнтів, у яких виконувалося біозварювання фістульного тракту [7, 8]. Враховуючи різний об'єм операційного втручання в залежності від групи спостереження, було отримано різну кількість матеріалу, яку для зручності розділили на внутрішньосфінктерну та позасфінктерну частини нориці та оцінені якісні та кількісні результати гісто-

логічного та імуногістологічного дослідження в кожній з представлених частин.

Отриманий матеріал фіксували в 10% розчині формаліну з наступним проведенням через спирти різної концентрації та заливанням у парафін. Готували серійні зрізи товщиною $4-5 \times 10^{-6}$ м. Гістологічне дослідження проводили за стандартною методикою.

Проводили окраску мікропрепаратів гематоксиліном та еозином, пікрофуксином за Ван Гізоном, за Малорі. Імуногістохімічне дослідження проводили на парафінових зрізах непрямым методом Кунса за методикою М. Brosman (1979) з використанням моноклональних антитіл до IL-6 та TNF α (Novocastra Laboratories Ltd. Мікропрепарати досліджували у мікроскопі «Olympus BX-41» (Японія), кількість імунних клітин рахували в полі зору при збільшенні в 400 разів.

Результати досліджень та їх обговорення

Матеріал, отриманий у першій групі спостереження, був представлений внутрішньосфінктерною та позасфінктерною частинами нориці прямої кишки. У внутрішньосфінктерній частині мікропрепаратів визначено переважно сполучнотканинний компонент, м'язовий та судинний. Сполучна тканина була представлена як зрілою, так і грануляційною тканинами; незалежно від локалізації набрякла, з місцями дезорганізації, у вигляді фібриноїдного набухання та некрозу, що визначалося окраскою за Малорі. У стромі було визначено запальну інфільтрацію, представлену лімфоцитами, макрофагами та нейтрофілами. Впродовж внутрішньої частини фістульного ходу визначалась грануляційна тканина, представлена сполучнотканинними та імунними клітинами, а також мікросудинами. При імуногістологічному дослідженні серед клітин запальних інфільтратів визначалися клітини, що продукують рецептори до IL-6 та TNF α (рис. 1).

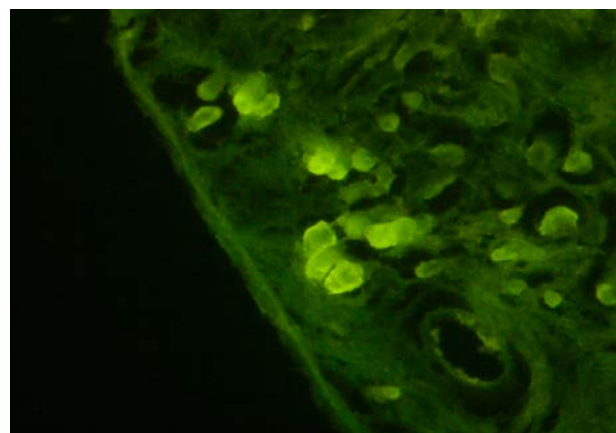


Рис. 1. Клітини-продуценти TNF α у грануляційній тканині стінки фістульного тракту. Спостереження 1 групи. Непрямий метод Кунса с МКА до TNF α , $\times 600$



Так, в полі зору мікроскопа середня кількість клітин-продуцентів до IL-6 склала $(32,0 \pm 4,0)$ екземплярів в полі зору, а до TNF α — $(24,0 \pm 3,0)$ екземплярів в полі зору. Звертало на себе увагу розташування клітин, так як вони в основному локалізувалися в зоні грануляційної тканини. У позасфінктерній частині фістульного тракту, а саме — в зоні зовнішнього норицевого отвору, визначено наявність плоского багатошарового епітелію з ороговінням та явищами акантозу. Базальна мембрана епідермісу місцями потовщена за рахунок склерозу, що підтверджено за рахунок вираженої осередкової фуксінофілії при окрасі за Ван-Гізоном. У дермі при окрасі за Малорі визначалися фуксінофільні пучки колагенових волокон з ознаками дезорганізації у вигляді фібриноїдних змін (рис. 2).

Сполучнотканинні елементи строми представлені фібробластиами, фіброцитами та макрофагами. Виявлялися масивні розростання грануляційної тканини, а також молоді сполучної тканини. У складі осередкової запальної клітинної інфільтрації також визначалися клітини-продуценти IL-6 та TNF α . Також, як і у внутрішньосфінктерній частині мікропрепаратів клітини локалізувалися навколо та в грануляційній тканині, а показники склали IL-6 $(25,0 \pm 2,0)$ екземплярів в полі зору, а TNF α $(17,0 \pm 1,0)$ екземплярів в полі зору (рис. 3).

Матеріал другої групи також був представлений внутрішньосфінктерною та позасфінктерною частинами мікропрепаратів, однак об'єм представленого матеріалу був меншим, за рахунок використання малоінвазивної модифікованої техніки LIFT при висіченні анальної фістули. Так як і у першій групі, при гістохімічному дослідженні були виявлені клітини, що експресують рецептори до IL-6 та TNF α (рис. 3).

Показники клітин продуцентів IL-6 у внутрішньосфінктерній частині мікропрепаратів склали $(30,0 \pm 3,0)$ екземплярів в полі зору, тоді як TNF α — $(22,0 \pm 3,0)$ екземплярів в полі зору. Відповідно до першої групи, у матеріалі позасфінктерної частини анальної фістули було виявлено клітини-продуценти IL-6 та TNF α . Локалізація клітин продуцентів цитокінів була аналогічною до першої групи. Показники клітин-продуцентів до IL-6 $(28,0 \pm 4,0)$ екземплярів в полі зору, а TNF α — $(20,0 \pm 3,0)$ екземплярів в полі зору).

У третій групі матеріал був представлений лише позасфінктерною частиною анальної фістули, що пов'язано з біозварюванням інтрасфінктерної частини фістульного тракту з висіченням позасфінктерного інфільтрату. У матеріалі переважала шкіра та підшкірна клітковина, м'язовий компонент був представлений скудно. Отримані морфологічні дані були аналогічними двом попереднім групам. Проведене імуногістохімічне типування клітин виявило клітини-продуценти цитокінів — кількість клітин-продуцентів до IL-6 склала $(27,0 \pm 3,0)$ екземплярів в полі зору, а до TNF α — $(18,0 \pm 2,0)$ екземплярів в полі зору.

У результаті проведеного порівняльного дослідження, як гістологічних, так і імуногістохімічних особливостей тканин нориць прямої кишки достовірних відмінностей між групами ми не виявили. Основними показниками порівняння стали ступінь вираженості хронічного запалення з урахуванням загострення запальної реакції і клональної характеристики імунних клітин. В усіх спостереженнях хронічний запальний процес проявився наявністю вираженої дифузної та осередкової запальної інфільтрації, що розташовувалася між сполучною та м'язовою тканинами. У її складі ви-

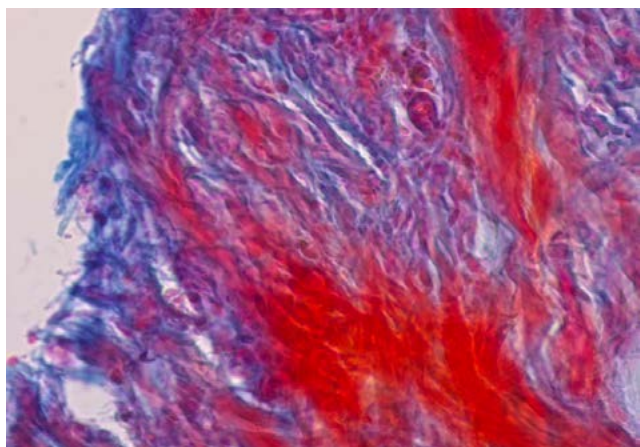


Рис. 2. набряк, фібриноїдне набухання та фібриноїдний некроз сполучної тканини у стінці фістульного тракту. Окраска за Малорі, $\times 400$

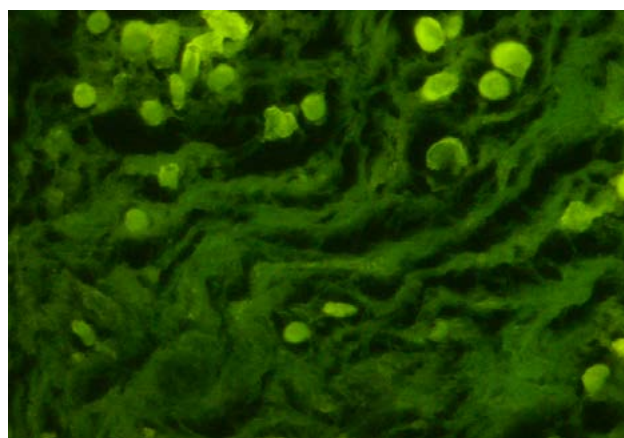


Рис. 3. Клітини-продуценти IL-6 у складі запальної інфільтрації стінок фістульного тракту. Спостереження 2 групи. Непрямий метод Кунса з МКА до IL-6, $\times 600$



значалися лімфоцити, макрофаги, плазматичні клітини. Визначену нами велику кількість клітин продуцентів ІЛ-6 та TNF α у грануляційній тканині та у незрілій сполучній тканині може бути обумовлено активною участю даних клітин у процесах колагенування. В літературі описані дані про роль прозапальних цитокінів у розвитку та збереженні нориць прямої кишки при хворобі Крона. Так TNF α у запальному інфільтраті індукує епітеліально-мезенхімальну трансформацію та стимулює матричні металопротеази, що призводить до ремоделювання тканин і утворення нориці. Значна кількість визначених клітин-продуцентів TNF α у стінці норицевого ходу у всіх наших групах спостереження може свідчити про наявність даної

ланки у морфогенезі утворення нориць прямої кишки.

Висновки

Проведені морфологічні дослідження свідчать про те, що у стінках фістульного ходу завжди існує запальний процес з загостренням на тлі альтеративних змін сполучнотканинного та м'язового компонентів, а також вираженого склерозу. Всі процеси супроводжуються продукцією великої кількості клітин-продуцентів ІЛ-6 та TNF α не тільки в запальній інфільтрації, але й в грануляційній тканині та незрілій сполучній тканині, що вказує на активну роль цих цитокінів у стимуляції процесів колагенування та рецидиві нориць.

REFERENCES

1. Van Onkelen RS, Gosselink MP, van Meurs M, Melief MJ, Schouten WR, Laman JD. Pro-inflammatory cytokines in cryptoglandular anal fistulas. *Techniques in Coloproctology*. 2016;20:9:619-25.
2. Haddow JB, Musbahi O, MacDonald TT, Knowles CH. Comparison of cytokine and phosphoprotein profiles in idiopathic and Crohn's disease-related perianal fistula. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*. 2019;10:4:42-53.
3. Sugrue J, Nordenstam J., Bartholomew A, Schwartz JL. Pathogenesis and persistence of cryptoglandular anal fistula: a systematic review. *Techniques in Coloproctology*. 2017;21:6:425-32.
4. Panes J, Rimola J. Perianal fistulizing Crohn's disease: pathogenesis, diagnosis and therapy. *Nat Rev. Gastroenterol Hepatol*. 2017;14:11:652-64.
5. El-Tawil AM. Mechanism of non-specific fistula-in-ano: hormonal aspects. Review. *Pathophysiology*. 2012;19:1:55-9.
6. Kryvoruchko IA, Parhomenko KYu, Bozhko OP, Firsyk TM. Minimalno invazyvna lihatsiia fistulnoho traktu (LIFT) pry khirurhichnomu likuvanni patsientiv z transsfinkternymy analnymy fistulamy. *Kharkivska khirurhichna shkola*. 2019;2:95:13-17.
7. Kryvoruchko IA, Sorokina IV, Parhomenko KYu, Firsyk TM, Bozhko OP. Modyfikovani metody khirurhichnoho likuvannya noryts priamoi kyshky. *Kharkivska khirurhichna shkola*. 2020;2:101:148-52.
8. Boyko VV, Kryvoruchko IA, Parhomenko KYu, Firsyk TM, Bozhko OP, Yevtushenko DO. Surgical treatment of rectal fistulae using biowelding. *International Journal of Education and Science*. 2019;2:3:53-8.
9. Kryvoruchko IA, Firsyk TM, Bozhko OP. Comparison of modified method of ligation of intersphincteric fistula tract (LIFT) and standard operations in patients with trans-sphincteric rectal fistulas. *Inter Collegas*. 2019;6:2:82-7.



РОЛЬ НЕКОТОРЫХ
ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ
ЦИТОКИНОВ В
ФОРМИРОВАНИИ
КРИПТОГЛЯНДУЛЯРНОЙ
АНАЛЬНОЙ ФИСТУЛЫ

*И. А. Криворучко,
И. В. Сорокина,
К. Ю. Пархоменко,
Т. Н. Фирсик,
А. П. Божко*

Реферат. Введение. Современные хирургические подходы к лечению свищей прямой кишки предусматривают выполнение операций, которые наименее повреждают сфинктерный комплекс и заключаются в необходимости полного иссечения анальной фистулы, что часто сопровождается значительным количеством рецидивов в зависимости от избранного метода операции. Существует предположение, что неудовлетворительные результаты можно объяснить воспалением, которое продолжается после хирургического лечения, а цитокины играют важную роль в этих процессах.

Цель исследования: оценить местную продукцию и определить роль IL-6 и TNF α в формировании свищей прямой кишки.

Материалы и методы. Ткань фистульного тракта была получена у 90 пациентов обеих полов с транссфинктерными свищами криптоглангулярного происхождения в период с сентября 2018 по февраль 2020 гг., которые перенесли оперативное лечение (фистулотомия, модифицированная техника LIFT, использование методики биосварки). В образцах замороженной ткани с помощью иммуногистологического исследования количественно оценивали наличие IL-6 и TNF α .

Результаты. Частота клеток, которые продуцируют IL-6, была наивысшей ($32,0 \pm 4,0$ экз. в п/з) не только в воспалительном инфильтрате, но и в грануляционной ткани и незрелой соединительной ткани фистульного тракта. Наименьшие показатели клеток-продуцентов IL-6 составили ($23,0 \pm 3,0$) экз. в п. з. Частота клеток продуцирующих рецепторы к TNF- α составила от ($17,0 \pm 1,0$) экз. в п. з. до ($24,0 \pm 3,0$) экз. в п. з.

Выводы. Значительное количество клеток-продуцентов IL-6 и TNF α в тканях указывает на активную роль этих цитокинов в формировании свищей прямой кишки.

Ключевые слова: транссфинктерные свищи прямой кишки, хирургическое лечение, цитокины, интерлейкин-6, фактор некроза опухоли α , результаты.

THE ROLE OF SOME
CYTOKINES IN THE
FORMATION OF
CRYPTOGLANDULAR
ANAL FISTULA

*I. A. Kryvoruchko,
I. V. Sorokina,
K. Yu. Parhomenko,
T. M. Firsyk,
O. P. Bozhko*

Abstract. *Aim.* Modern surgical approaches to the treatment of anal fistulas involve operations that least damage the sphincter complex of the rectum. The essence of the operation is a complete excision of the anal fistula, which is often accompanied by a significant number of recurrences depending on the chosen method of operation. Failure is likely the result of inflammation that persists after surgery, and cytokines play an important role in these processes.

The aim of the study: evaluate local production and determine the role of IL-6 and TNF α in the formation of rectal fistulas.

Materials and methods. The tissue of the fistula tract was obtained in 90 patients of both sexes with transsphincteric fistula of cryptoglandular origin in the period from September 2018 to February 2020, who underwent surgery (fistulotomy, modified technique LIFT, use of biowelding technique of the fistula tract).

Results. The frequency of IL-6 producing cells was highest (32.0 ± 4.0) specimens in the field of view not only in inflammatory infiltrate, but also in granulation tissue and immature connective tissue of the fistula tract. The lowest rates of IL-6 producing cells were (23.0 ± 3.0) specimens in the field of view. The frequency of TNF α receptor-producing cells ranged from (17.0 ± 1.0) specimens in the field of view to (24.0 ± 3.0) specimens in the field of view.

Conclusions. A large number of IL-6 and TNF α -producing cells has been identified not only in inflammatory infiltration but also in granulation and immature connective tissue, indicating the active role of these cytokines in the formation of rectal fistulas.

Key words: rectal fistula, cytokines, interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α).