



УДК 616-022.61-002.001.8

«Журнал НАМН України» | 2021 | т. 27 | № 2 | С. 90-99

<https://doi.org/10.37621/JNAMSU-2021-2-3>

Фіброз: поліетіологічне ускладнення зі спільним знаменником

**Д. І. Заболотний¹, Ю. В. Дєєва²,
Ю. М. Гурженко³, Д. Д. Заболотна¹,
Ю. А. Гордієнко⁴, М. Д. Тимченко¹,
Н. М. Ворошилова¹, С. В. Пакришень⁵,
С. В. Верьовка¹**

¹ДУ «Інститут отоларингології
ім. проф. О. С. Коломійченка НАМН України»,
вул. Зоологічна, 3, Київ 03057, Україна

²Національний медичний університет
ім. О. О. Богомольця, б-р Тараса Шевченка, 13,
Київ 01601, Україна

³ДУ «Інститут урології НАМН України»,
вул. Володимира Винниченка, 9а, Київ 04053,
Україна

⁴Дніпровський державний медичний
університет, вул. Володимира Вернадського, 9,
Дніпро 49044, Україна

⁵КНП «Олександрівська клінічна лікарня м. Києва»,
вул. Шовковична, 39/1, Київ 01601, Україна

Стан проблеми. Розростання фіброзної сполучної тканини є поширеним ускладненням різноманітних патологічних процесів, що істотно ускладнює одужання та становить одну з провідних причин смертності. Незважаючи на багаторічні дослідження, процес розвитку фіброзу залишається недостатньо вивченим і містить велику кількість «білих плям». Фіброзу притаманні непередбачуваність виникнення, схильність до розростання та низький рівень заміщення нормальною сполучною тканиною. Не меншої уваги

Fibrosis: polyetiologic complication with common denominator

**Dmytro I. Zabolotnyi¹, Yuliia V. Dieieva²,
Yurii M. Gurzhenko³, Diana D. Zabolotna¹,
Iuliia A. Gordiienko⁴, Marina D. Tymchenko¹,
Natalia M. Voroshylova¹,
Svitlana V. Pakrishen⁵, Serhij V. Verevka¹**

¹SI “O. S. Kolomyichenko Institute
of Otolaryngology of National Academy of Medical
Sciences of Ukraine”, 3 Zoolohichna Str., Kyiv 03057,
Ukraine

²Bogomolets National Medical University,
13 Tarasa Shevchenka Blvd., Kyiv 01601,
Ukraine

³SI «Institute of Urology of NAMS of Ukraine»,
9a Volodymyra Vynnychenka Str., Kyiv 04053,
Ukraine

⁴Dnipro State Medical University, 9 Volodymyra
Vernadskoho Str., Dnipro 49044, Ukraine

⁵Oleksandrivska Clinical Hospital, 39/1
Shovkovychna Str., Kyiv 01601, Ukraine

State of the problem. The growth of fibrous connective tissue is a common complication of various pathological processes, which significantly complicates recovery and is one of the leading causes of death. Despite many years of research, the process of fibrosis development remains insufficiently studied and contains a large number of “white spots”. Fibrosis is characterized by unpredictability, propensity to grow and low level of the replacement by normal connective tissue. The structure of fibrous tissue, its

заслугують і сама структура фіброзної тканини, її відмінності від нормальної та причини утворення цих відмінностей. При цьому формуванню фіброзної тканини передують процес ендогенної інтоксикації – утворення та накопичення різноманітних аномальних метаболітів. Серед останніх провідне місце належить білкам та пептидам, чия структура у той чи інший спосіб порушена й дестабілізована. Відомо, що дестабілізовані білки схильні до агрегації. Цей процес, всупереч поширеній думці, відбувається не хаотично, а відповідає певним закономірностям і спрямований у бік мінімізації вільної енергії. В цьому відношенні визначеним фаворитом є утворення β -структурованих фібрил, що посідають чи не найнижчий енергетичний рівень серед білкових конформаційних станів. Подібні фібрили відзначаються нерозчинністю, стійкістю до протеолізу, імуногенністю і здатністю до автохтонного розростання за рахунок сорбції та конформаційної перебудови розчинних білків. Класичним прикладом подібної агрегації є амілоїдоутворення, однак існують вагомі резони припустити подібні ж процеси при утворенні інших патологічних тканин.

Мета роботи полягала в експериментальній перевірці наявності β -структурованих білкових агрегатів у складі фіброзних тканин, відмінних між собою за етіологією.

Методична частина включала відбір операційного матеріалу, його фіксацію в 10 % розчині формальдегіду, приготування профарбованих Конго червоним гістологічних препаратів і мікроскопічне дослідження в світловому, поляризаційному та люмінесцентному режимах.

Результати. Експериментально доведено присутність β -структурованих білкових агрегатів у фіброзних тканинах, утворених внаслідок локального хронічного запалення, вірусного інфікування та побічної дії медикаментозних препаратів. Виявлене явище дозволяє наблизитись до розуміння механізмів розвитку фіброзу та постулювати положення про ключову роль в цьому процесі регулярної агрегації дестабілізованих білків.

Висновки. Отримані експериментальні дані дозволяють припустити загальну й невід'ємну участь β -структурованих білкових агрегатів у формуванні різних за етіологією фіброзних тканин. Показано присутність цих депозитів у фіброзних тканинах, утворених внаслідок локального хронічного запалення, вірусного інфікування та побічної дії цитостатика доксорубіцину. Обговорюється провідна роль порушення білкового гомеостазу і локального накопичення структурно ушкоджених білків як передумови до автохтонного агрегаційного процесу. Показано доцільність застосування люмінесцентної мікроскопії, що істотно розширює можливості виявлення за допомогою Конго червоного нанорозмірних β -структурованих білкових агрегатів, невидимих через обмеження Аббе у світловій та поляризаційній мікроскопії.

Ключові слова: фіброз, келоїдоз, хвороба Пейроні, COVID-19, цитостатики, наночастки.

Для цитування: Заболотний ДІ, Деева ЮВ, Гурженко ЮМ, Заболотна ДД, Гордієнко ЮА, Тимченко МД, Ворошилова НМ, Пакришень СВ, Вєрєвка СВ. Фіброз: поліетіологічне ускладнення зі спільним знаменником. Журнал Національної академії медичних наук України. 2021;27(2):90–99. <https://doi.org/10.37621/JNAMSU-2021-2-3>.

Стаття надійшла до редакції 07.07.2021 року
Направлена на рецензування 07.07.2021 року
Прийнята до друку 15.07.2021 року

differences from normal and the reasons for the formation of these differences deserve no less attention. The formation of fibrous tissue is preceded by the process of endogenous intoxication – the formation and accumulation of various abnormal metabolites. Among the latter, the leading place belongs to proteins and peptides, whose structure is disrupted and destabilized. It is known that destabilized proteins are prone to aggregation. This process, contrary to popular belief, is not chaotic, but is subject to certain laws and is aimed at minimizing of free energy. With regard of the latter circumstance a definite favorite is the formation of β -structured fibrils, which occupy almost the lowest energy level among protein conformational states. Such fibrils are characterized by insolubility, resistance to proteolysis, immunogenicity and the ability to autochthonous growth due to sorption and conformational rearrangement of soluble proteins. A classic example of such aggregation is amyloid formation, but there are good reasons to assume similar processes in the formation of other pathological tissues.

The aim of the work was to verify experimentally the presence of β -structured protein aggregates in fibrous tissues, which differ in etiology.

The methodical part included the selection of surgical material, its fixation in 10 % formaldehyde solution, preparation of Congo-stained red histological specimens and microscopic examination in light, polarization and fluorescence modes.

Results. The presence of β -structured protein aggregates in fibrous tissues formed due to local chronic inflammation, viral infection and side effects of drugs has been proven experimentally. The identified phenomenon allows us to approach the understanding of the mechanisms of fibrosis development and to postulate a key role of regular aggregation of destabilized proteins.

Conclusions. The obtained data testifies to a general and integral participation of β -structured protein aggregates in the formation of fibrous tissues of different etiologies. The presence of these deposits in fibrous tissues formed due to local chronic inflammation, viral infection and side effects of the cytostatic doxorubicin has been shown. The leading role of violation of protein homeostasis and local accumulation of structurally damaged proteins as a prerequisite for autochthonous aggregation process is discussed. The expediency of fluorescence microscopy has been shown, which significantly expands the possibilities of detecting with the help of the Congo red of nanosized β -structured protein aggregates, which are invisible due to Abbe's limitations in light and polarization microscopy.

Key words: fibrosis, keloidosis, Peyronie's disease, COVID-19, cytostatics, nanoparticles.

For citation: Zabolotnyi DI, Dieieva YV, Gurzhenko YM, Zabolotna DD, Gordiienko IA, Tymchenko MD, Voroshylova NM, Pakrishen SV, Verevka SV. Fibrosis: polyetiologic complication with common denominator. Journal of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine. 2021;27(2):90–99. <https://doi.org/10.37621/NAMSU-2021-2-3>.

The article was received 07.07.2021
For review, 07.07.2021
Accepted for publication on 15.07.2021



ВІДОМОСТІ ПРО АВТОРІВ

Заболотний Дмитро Ілліч – д. м. н., проф., академік НАМН України, директор ДУ «Інститут отоларингології ім. проф. О. С. Коломійченка НАМН України», Київ, *ORCID: 0000-0002-4848-840X*;

Дєєва Юлія Валеріївна – д. м. н., проф., завідувач кафедри оториноларингології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця, Київ, *ORCID: 0000-0003-0552-1254*;

Гурженко Юрій Миколайович – д. м. н., проф., головний науковий співробітник відділу сексопатології і андрології, ДУ «Інститут урології НАМН України», Київ, *ORCID: 0000-0002-9116-2157*;

Заболотна Діана Дмитрівна – д. м. н., проф., завідувачка відділу ринології та алергології з групою рентгенології ДУ «Інститут отоларингології ім. проф. О. С. Коломійченка НАМН України», Київ, *ORCID: 0000-0001-7807-8148*;

Гордієнко Юлія Анатоліївна – к. б. н., провідний науковий співробітник, Дніпровський державний медичний університет, Дніпро, *ORCID: 0000-0003-0788-2176*;

Тимченко Марина Дмитрівна – к. б. н., провідний науковий співробітник лабораторії патофізіології та імунології ДУ «Інститут отоларингології ім. проф. О. С. Коломійченка НАМН України», Київ, *ORCID: 0000-0002-2734-604X*;

Ворошилова Наталя Михайлівна – к. б. н., старший науковий співробітник лабораторії біохімії ДУ «Інститут отоларингології ім. проф. О. С. Коломійченка НАМН України», Київ, *ORCID: 0000-0002-7174-2090*;

Пакиришнь Світлана Віталіївна – завідувач патологоанатомічного відділення КНП «Олександрівська клінічна лікарня м. Києва», Київ;

Верьовка Сергій Вікторович – д. б. н., проф., завідувач лабораторії біохімії ДУ «Інститут отоларингології ім. проф. О. С. Коломійченка НАМН України», Київ, *ORCID: 0000-0002-3578-7996*.



INFORMATION ABOUT AUTHORS

Dmitry I. Zabolotnyi – Dr. Sci. (Medicine), Prof., Academician of the NAMS of Ukraine, Director of the State Institution "O. S. Kolomyichenko Institute of Otolaryngology, NAMSU", Kyiv, Ukraine, *ORCID: 0000-0002-4848-840X*;

Yuliia V. Dieieva – Dr. Sci. (Medicine), Prof., Head of the Department of Otorhinolaryngology, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine, *ORCID: 0000-0003-0552-1254*;

Yurii M. Gurzhenko – Dr. Sci. (Medicine), Prof., Chief Research Fellow, Department of Sexopathology and Andrology, State Institution "Institute of Urology of NAMS of Ukraine", Kyiv, Ukraine, *ORCID: 0000-0002-9116-2157*;

Diana D. Zabolotna – Dr. Sci. (Medicine), Prof., Head of the Department of Rhinology and Allergology with the group of radiology, State Institution "O. S. Kolomyichenko Institute of Otolaryngology, NAMSU", Kyiv, Ukraine, *ORCID: 0000-0001-7807-8148*;

Iuliia A. Gordiienko – Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher, Dnipro State Medical University, Dnipro, Ukraine, *ORCID: 0000-0003-0788-2176*;

Marina D. Tymchenko – Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher of the Laboratory of Pathophysiology and Immunology, State Institution "O. S. Kolomyichenko Institute of Otolaryngology, NAMSU", Kyiv, Ukraine, *ORCID: 0000-0002-2734-604X*;

Natalia M. Voroshylova – Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher at the Biochemistry Laboratory, State Institution "O. S. Kolomyichenko Institute of Otolaryngology, NAMSU", Kyiv, Ukraine, *ORCID: 0000-0002-7174-2090*;

Svitlana V. Pakrishen – Head of the of Pathology Department of Oleksandrivska Clinical Hospital, Kyiv, Ukraine;

Serhij V. Verevka – Dr. Sci. (Biology), Prof., Head of the Laboratory of Biochemistry of the State Institution "O. S. Kolomyichenko Institute of Otolaryngology, NAMSU", Kyiv, Ukraine, *ORCID: 0000-0002-3578-7996*.

Serhij V. Verevka 

ORCID: 0000-0002-3578-7996

verevka.biochem@gmail.com

Згідно із загальноприйнятим визначенням, фіброз є наслідком надмірного накопичення сполучної тканини в ушкодженій у будь-який спосіб тканині та безпосередньому її оточенні [1]. Подібне патологічне загоєння ран призводить до зниження функціональності відповідного органу, а в певних випадках – і смерті [2]. Новоутворена сполучна тканина заміняє нормальну паренхіматозну, що веде до формування постійної рубцевої тканини. Таке ремоделювання тканин викликає поступову втрату специфічних функцій відповідного органу [3]. Фіброз печінки, нирок, легень та серцево-судинної системи відзначається високою морбідністю. До недавня смертність, обумовлену фіброзними ускладненнями, оцінювали в щонайменше 800 000 випадків на рік [4], однак пандемія COVID-19 істотно скоригувала цю величину. Фіброзні ускладнення часто відзначаються не-

передбачуваністю виникнення, поліорганністю та поліетіологічністю. Їх провідною причиною визнано хронічні запальні процеси, однак перелік тригерних механізмів фіброзу включає також інфекційно-алергічні процеси, травми, опромінення, онкологічні процеси, вплив токсичних речовин і побічні ефекти цілого ряду медикаментозних препаратів [5]. До механізмів утворення фіброзної тканини належить і епітеліально-мезенхімальний перехід, за якого епітеліальні клітини набувають властивостей мезенхімальних клітин, що здатні активно секретувати компоненти позаклітинного матриксу – колагени і фібронектин [5]. До причин фіброзу легень належать наслідки тривалого вдихання індустріального та органічного пилу, гранулематозні легеневі захворювання, колагенози та опромінення [1]. Повний перелік причин розвитку фіброзних ускладнень навряд чи буде

коли-небудь завершено, однак певне уявлення про них наведено в таблиці.

З очевидних причин механізми формування та розвитку фіброзних ускладнень знаходяться у фокусі неослабної уваги фахівців медико-біологічного профілю. Накопичено величезний за об'ємом матеріал щодо молекулярних і клітинних механізмів розвитку фіброзу, ролі в ньому окремих систем організму, можливих ускладнень та методичних підходів до їх запобігання. Однак залишається без відповіді низка питань, що стосуються причин виникнення фіброзної тканини, схильності її до неконтрольованого розростання, практична відсутність її заміщення нормальною сполучною тканиною [3]. Не меншої уваги варте з'ясування питання про причини подібності утворюваних фіброзних структур в найрізноманітніших органах та під впливом різних за характером

ушкоджень [5], обґрунтованості думки про утворення фіброзної тканини як реакції організму на те чи інше локальне ушкодження. Все це змушує звернути увагу на структуру фіброзної тканини, вірніше – на її міжклітинну складову. Наукові здобутки останніх років дозволяють припустити існування спільного чинника для утворення фіброзних тканин різноманітного походження, провідну роль структури міжклітинної складової фіброзної тканини і провести експериментальну перевірку цього припущення.

Як вже відмічено, провідною причиною розвитку фіброзу визнано локальне хронічне запалення. Невід'ємною обставиною розвитку запального процесу є складний комплекс молекулярних порушень, що обумовлюють розвиток ендогенної інтоксикації – утворення та локального накопичення значних кількостей аномальних мета-

ТАБЛИЦЯ / TABLE

ПРОВІДНІ ТКАННИНИ, ЯКІ ЗАЗНАЮТЬ ФІБРОЗНОГО УРАЖЕННЯ, ТА ЧИННИКИ, ЩО ЇЙМУ СПРИЯЮТЬ [5] / MAJOR TISSUES AFFECTED BY FIBROSIS AND POSSIBLE CONTRIBUTING FACTORS [5]

Печінка / Liver	Вірусний гепатит, алкоголізм, різноманітні фактори, що обумовлюють цирроз / Viral hepatitis, schistosomiasis, and alcoholism are leading causes of cirrhosis worldwide
Легені / Lung	Широка група захворювань, для яких пульмонарне запалення та фіброз є звичайним проявом патологічного процесу. До цієї групи належать понад 150 захворювань, включаючи саркоїдоз, силікоз, реакцію на ліки та інфекційні агенти, а також колагенові судинні захворювання, такі як ревматоїдний артрит, системний склероз (склеродерма). Найпоширенішим типом цієї групи захворювань є ідіопатичний пульмонарний фіброз, що не має з'ясованої причини / The interstitial lung diseases (ILDs) include a diverse set of disorders in which pulmonary inflammation and fibrosis are the final common pathological manifestations. There are more than 150 different causes of ILDs, including sarcoidosis, silicosis, drug reactions and infections, as well as collagen vascular diseases, such as rheumatoid arthritis and systemic sclerosis (scleroderma). Idiopathic pulmonary fibrosis, the most common type of ILD, has no known cause
Нирки / Kidney	Діабетичне ушкодження та рубцювання нирок, що можуть призводити до прогресуючої втрати функції. Може ускладнюватись невилікованою гіпертензією / Diabetes damages and scars the kidneys, which can lead to a progressive loss of function. Untreated hypertension can contribute
Серцево-судинні захворювання / Heart and vascular diseases	Серцевий рубець, утворений внаслідок гострого серцево-судинного захворювання, може погіршувати здатність серця до прокачування крові. Цьому сприяють гіпертензія, атеросклероз та рестеноз / Following a heart attack, scar tissue can impair the ability of the heart to pump blood. Hypertension, atherosclerosis and restenosis also contribute
Очі / Eyes	Дегенерація жовтої плями, вітреальна ретинопатія та ретинопатія сітківки може призвести до сліпоти / Macular degeneration, retinal and vitreal retinopathy can lead to blindness
Шкіра / Skin	Включає келоїди та гіпертрофічні рубці. Системний склероз і склеродерма, запалення та генетичні фактори також можуть бути сприятливими чинниками / Including keloids and hypertrophic scars. Systemic sclerosis and scleroderma, burns and genetic factors may also contribute
Підшлункова залоза / Pancreas	Мало визначені, однак можливі, аутоімунні та спадкові випадки / Poorly understood but possible autoimmune/hereditary causes
Кишечник / Intestine	Хвороба Крона, запальна хвороба кишечника. Патогенні організми / Crohn's disease/inflammatory bowel disease. Pathogenic organisms
Мозок / Brain	Хвороба Альцгеймера, СНІД / Alzheimer's disease, AIDS
Кістковий мозок / Bone marrow	Онкологічні захворювання та вікові зміни / Cancer and ageing
Поліорганний фіброз / Multi-organ fibrosis	(а) Внаслідок ускладнень хірургічного лікування рубцева тканина може утворюватись між внутрішніми органами, викликаючи контрактуру, біль, а в окремих випадках – безпліддя; (б) хіміотерапевтичний фіброз, обумовлений медикаментами; (в) фіброз, індукований радіотерапією онкологічних захворювань чи випадковим впливом; (г) механічне ушкодження / (a) Due to surgical complications; scar tissue can form between internal organs, causing contracture, pain and, in some cases, infertility; (b) chemotherapeutic drug-induced fibrosis; (c) radiation-induced fibrosis as a result of cancer therapy/accidental exposure; (d) mechanical injuries

болітів, зокрема – білкових молекул, що зазнали ускладнення нативної структури [6, 7]. Це не лише ускладнює функціонування опосередкованих цими білками систем, але й обумовлює розвиток аутоімунних реакцій. Дестабілізація нативної структури обумовлює схильність білкових молекул до агрегації в бік мінімізації вільної енергії системи. При цьому найнижчий енергетичний рівень агрегації білкових молекул відповідає утворенню β -структурованих фібрил [8, 9]. Найбільш характерний і досліджений випадок подібного структуроутворення *in vivo* пов'язаний з розвитком амілоїдозів – групи ускладнень різноманітних захворювань, за яких порушення процесів обміну білків призводить до формування відкладень β -структурованих білкових агрегатів [10, 11]. Однак подібне енергетично вигідне та регулярне структуроутворення дестабілізованих білків не обмежується одними лише амілоїдозами. Подібні структури виявлено в складі цілої низки злоякісних і доброякісних новоутворень, зокрема келоїдних рубців – пухлиноподібного розростання грубої сполучної тканини шкіри, що супроводжує травми різноманітної природи і є типовим прикладом фіброзної тканини [12]. Келоїди схильні до спонтанного розростання, рецидивності, а за неправильного лікування – й малігнізації. Вони ніколи не зникають самі по собі [3]. З наведених міркувань варто перевірити присутність β -структурованих білкових агрегатів у складі фіброзних тканин різної локалізації та етіології. Проведення подібної перевірки полегшується існуванням добре відпрацьованих методів виявлення β -структурованих білкових агрегатів. До класичних підходів належать рентгеноструктурні методи, методи дисперсії оптичного обертання і кругового дихроїзму, спектроскопія в інфрачервоному діапазоні. Водночас регулярність структури β -структурованих агрегатів обумовила розвиток мікроскопічних методів, що ґрунтуються на взаємодії досліджуваних об'єктів з барвниками, специфічними до β -складчастих структур та інертними до інших тканин [13]. Після широкого застосування найрізноманітніших барвників у двадцять роки минулого сторіччя в науково-дослідницький обіг було введено Конго червоний, що селективно зв'язує амілоїдні структури та не взаємодіє зі здоровими тканинами [14]. Він належить до вітальних барвників і може бути введений до кровообігу з метою діагностики амілоїдозу. Показано, що взаємодія Конго червоного з розчинними білковими молекулами не лише не індукує, але й блокує неконтрольовану агрегацію, що також збільшує інформаційну цінність цього барвника [15, 16]. Незважаючи на досить давнє походження і появу нових високочутливих барвників, Конго червоний широко застосовують в наукових дослідженнях, клінічній і лабораторній діагностиці [17]. Обумовлено це його здатністю вибірково та кількісно забарвлювати β -структуровані агрегати в різні відтінки цегельно-червоного кольору, не зв'язуючись зі здоровими тканинами, зокрема, з колагеном. Завдяки регулярності структури профарбовані Конго червоним β -структуровані білкові агрегати в поляризаційному мікроскопі набувають різних відтінків яблучно-зеленого забарвлення, на відміну від затемнених оптично неак-

тивних структур. Характерне забарвлення тканин у світловому та поляризаційному мікроскопах визнано «золотим стандартом» виявлення амілоїдів і широко застосовується в гістологічній діагностиці. Значно менш відомою, хоч і не менш вагомою, властивістю профарбованих Конго червоним амілоїдів є їхня здатність до червоної флуоресценції в ультрафіолетовому світлі [11]. Це дозволяє обійти дифракційне обмеження Аббе, згідно з яким об'єкти, менші за 0,61 довжини світлової хвилі, є невидимими. Утворення подібних супрамолекулярних об'єктів не може не впливати на функціональні властивості тканин і заслуговує найретельнішого дослідження. В останні десятиріччя створено велику кількість хромогенних та флуорогенних сполук, що за чутливістю значно перевершують Конго червоний [17], однак для вирішення завдання нашого дослідження – виявлення присутності β -структурованих білкових агрегатів у складі фіброзних тканин різної природи за комплексного використання світлової, поляризаційної та флуоресцентної мікроскопії – застосування цього старого, але все ще актуального барвника видається повною мірою відповідним.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Проведено відбір операційного матеріалу з фіксацією у 10 % розчині формальдегіду, що гарантувало від спонтанного утворення β -структурованих агрегатів та отримання хибно-позитивних результатів [18]. Оцінку структури досліджуваних гістологічних препаратів проводили з фарбуванням пікратом фуксину за Ван Гізоном для виявлення колагенових структур, гематоксиліном та еозином – для загальної оцінки структури тканин та класичне фарбування на амілоїд Конго червоним за Пухтлером–Маєром [19]. Отримані препарати досліджували у світловому, поляризаційному та люмінесцентному мікроскопах.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Келоїдні рубці належать до типових представників фіброзних тканин [3]. Забарвлення їх препаратів гематоксиліном та еозином не надає будь-якої інформації щодо їхньої структури, хіба що підтверджує нерегулярність фіброзних колагенових структур [20]. Забарвлення пікратом фуксину також свідчить про колагенову структуру келоїдних тканин (рис. 1).

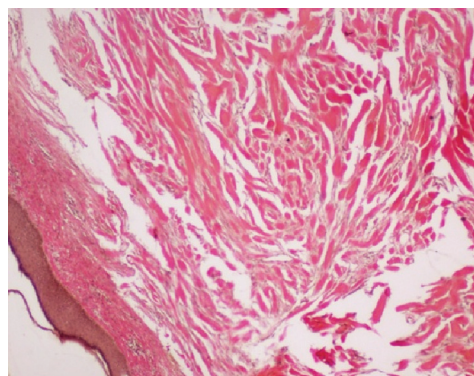


Рис. 1 / Fig. 1. Келоїд вушної раковини. Забарвлення пікратом фуксину за ван Гізоном. $\times 40$ / Keloid of the auricle. Picrate fuchsin by Van Gieson. Light microscopy. $\times 40$.

Натомість при забарвленні Конго червоним виявлено наявність у складі келоїдних тканин амілоїдоподібних включень, що спостерігаються як забарвлені в різні відтінки цегельно-червоного кольору в світловому мікроскопі (рис. 2 А та С) та яблучно-зеленого в поляризаційному (рис. 2 В та D).

Варто підкреслити, що подібність забарвлення келоїдних тканин та амілоїдів Конго червоним подекуди трактується як свідчення недостатньої селективності цього барвника як специфічного лише до амілоїдів [16, 19]. Однак в контексті визначення структури амілоїдів як β -структурованих білкових агрегатів [21] і з'ясування виключно високої енергетичної вигідності утворення останніх [8] подібне твердження видається необґрунтованим. Варто згадати, що присутність амілоїдоподібних структур у

складі келоїдних рубців та окремих інших патологічних тканин показано за допомогою цілої низки барвників задовго до введення в науково-дослідницький обіг Конго червоного [22]. З наведених міркувань треба визнати Конго червоний барвником, специфічним до β -структурованих білкових агрегатів, причому останні можуть бути як амілоїдами, так і іншими структурами, утвореними внаслідок порушення білкового метаболізму.

Досить подібна до келоїдних тканин картина спостерігається і для фіброзних відкладень при хворобі Пейроні (фібропластична індурація статевого члена). При забарвленні препаратів гематоксиліном та еозином спостерігали порушення структури колагенових волокон (рис. 3 А), що забарвлюються пікратом фуксину за Ван Гізоном у характерний колір (рис. 3 В).

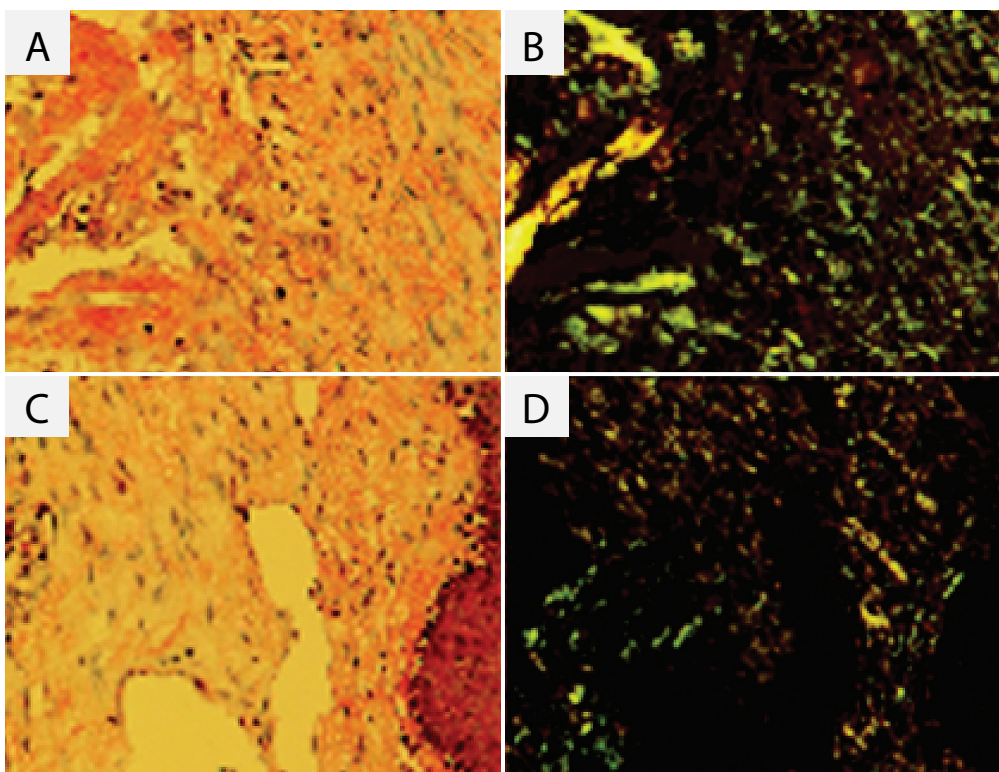


Рис. 2 / Fig. 2. Препарати келоїдів вушної раковини: А та С – світлова мікроскопія, В та D – поляризаційна мікроскопія. Забарвлення Конго червоним. $\times 200$ / Preparations of keloids of the auricle. Light microscopy (A and C), polarization microscopy, (B and D). Congo red. $\times 200$.

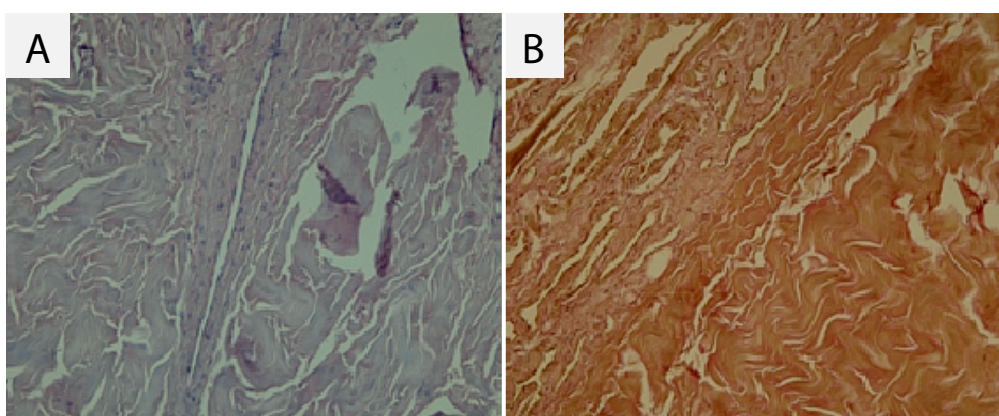


Рис. 3 / Fig. 3. Препарати фіброзного ущільнення при хворобі Пейроні: А – забарвлення гематоксиліном та еозином; В – забарвлення пікратом фуксину за Ван Гізоном. Світлова мікроскопія. $\times 200$ / Preparations of fibrous compaction in Peyronie's disease: A – staining with hematoxylin and eosin; B – staining with picrate fuchsin by Van Gieson. Light microscopy. $\times 200$.

Тобто спостерігається аналогічне до келоїдів хаотичне розміщення колагенових волокон. При забарвленні ж Конго червоним спостерігаються типові для β -структурованих білкових агрегатів включення різних відтінків цегельно-червоного у світловому та яблучно-зеленого – в поляризаційному режимах (рис. 4).

Як келоїдні тканини, так і відкладення в білковій оболонці статевого члена при хворобі Пейроні є типовими прикладами розвитку фіброзу внаслідок локального накопичення продуктів ендогенної інтоксикації, обумовленої спричиненим травмою запаленням [23].

Запалення, обумовлені інфекційними агентами, також призводять до локального порушення обміну білків, накопичення продуктів ендогенної інтоксикації і, як наслідок, формування відкладень β -структурованих білкових агрегатів [24]. Порушення структури та функціонування кровоносних судин є визнаною причиною розвитку фіброзу [5]. Так, характерною рисою перебігу COVID-19 є тромбоз, обумовлений нефункціональною активацією системи зсідання крові компонентами пошкодженого вірусною інфекцією ендотелію судин [25]. Це різко ускладнює процеси обміну речовин, сприяє розвитку ендогенної інтоксикації і, як наслідок, може призводити до формування агрегатів ушкоджених білків. Так, тканини легень осіб, які померли внаслідок обумовленого COVID-19 фіброзу, містять відкладення β -структурованих білкових агрегатів, що більш чи менш виражено спостерігаються у світловому та поляризаційному мікроскопах (рис. 5 А, D та В, Е, відповідно). Дослідження цих же препаратів із застосуванням люмінесцентної мікроскопії показує тотальне засмічення фіброзних тканин подібними включеннями (рис. 5 С та F). Очевидно, що за подібних умов про повноцінне функціонування будь-якого органу не може бути й мови – з відповідними наслідками для організму в цілому.

Застосування низки медикаментозних препаратів також може сприяти розвитку фіброзу. Здебільшого це препарати, що в той чи інший спосіб впливають на ДНК клітини. До таких належать антрациклінові антибіотики, що чинять кардіотоксичний вплив. Цитотоксичний ефект даних антибіотиків зумовлений блокуванням синтезу нуклеїнових кислот, що призводить до метаболічних змін. Порушення ж біосинтезу та обміну білків може, в свою чергу, призводити до розвитку агрегаційних процесів. Результати дослідження у світловому та поляризаційному мікроскопах забарвлених Конго червоним зразків тканин щурів, підданих впливу доксорубіцину [26, 27], свідчать на користь цієї думки (рис. 6).

Натомість забарвлені Конго червоним тканини міокарду набули темно-коричневого кольору і не виявляли вираженої оптичної активності в поляризаційному мікроскопі. При дослідженні ж у люмінесцентному мікроскопі виявлено тотальну червону люмінесценцію (рис. 7).

Тобто, спостерігається масоване відкладення нанорозмірних β -структурованих білкових агрегатів, що через обмеження Аббе є невидимими в світловому діапазоні, однак виявляються внаслідок люмінесценції за належної світлової індукції. Це різко збільшує інформативну цінність специфічного до β -структурованих білкових агрегатів барвника Конго червоного. До переваг цієї сполуки належить здатність до осаджування нанорозмірних білкових агрегатів, що утворюються в організмі людини за захворювань, пов'язаних з порушенням білкового метаболізму [28]. Ця ж властивість призводить до побічних ефектів сполук гадолінію Gd^{3+} , що застосовуються як речовини-контрастери при магнітно-резонансній томографії. Це різко збільшує інформативність МРТ-діагностики, однак побічним ефектом застосування сполук Gd^{3+} є розвиток фіброзу [29, 30].

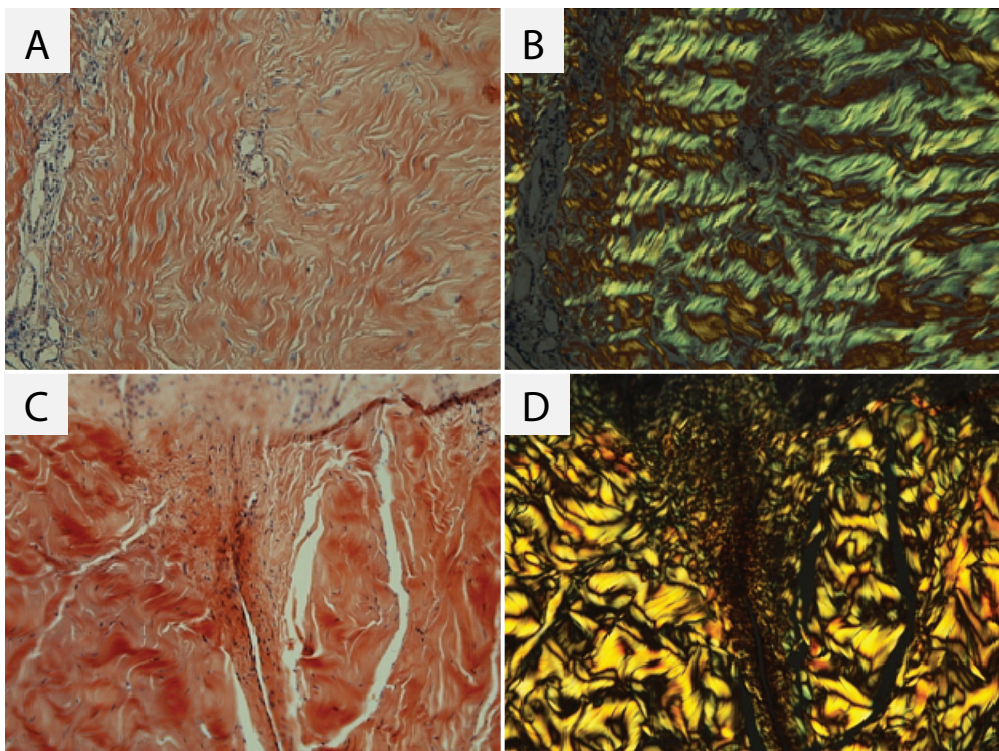


Рис. 4 / Fig. 4. Препарати фіброзного ущільнення при хворобі Пейроні: А, С – світлова мікроскопія, В, D – поляризаційна мікроскопія. Конго червоний. $\times 200$ / Preparations of fibrous compaction of Peyronie's disease: A, C – light microscopy; B, D – polarization microscopy. Congo red. $\times 200$.

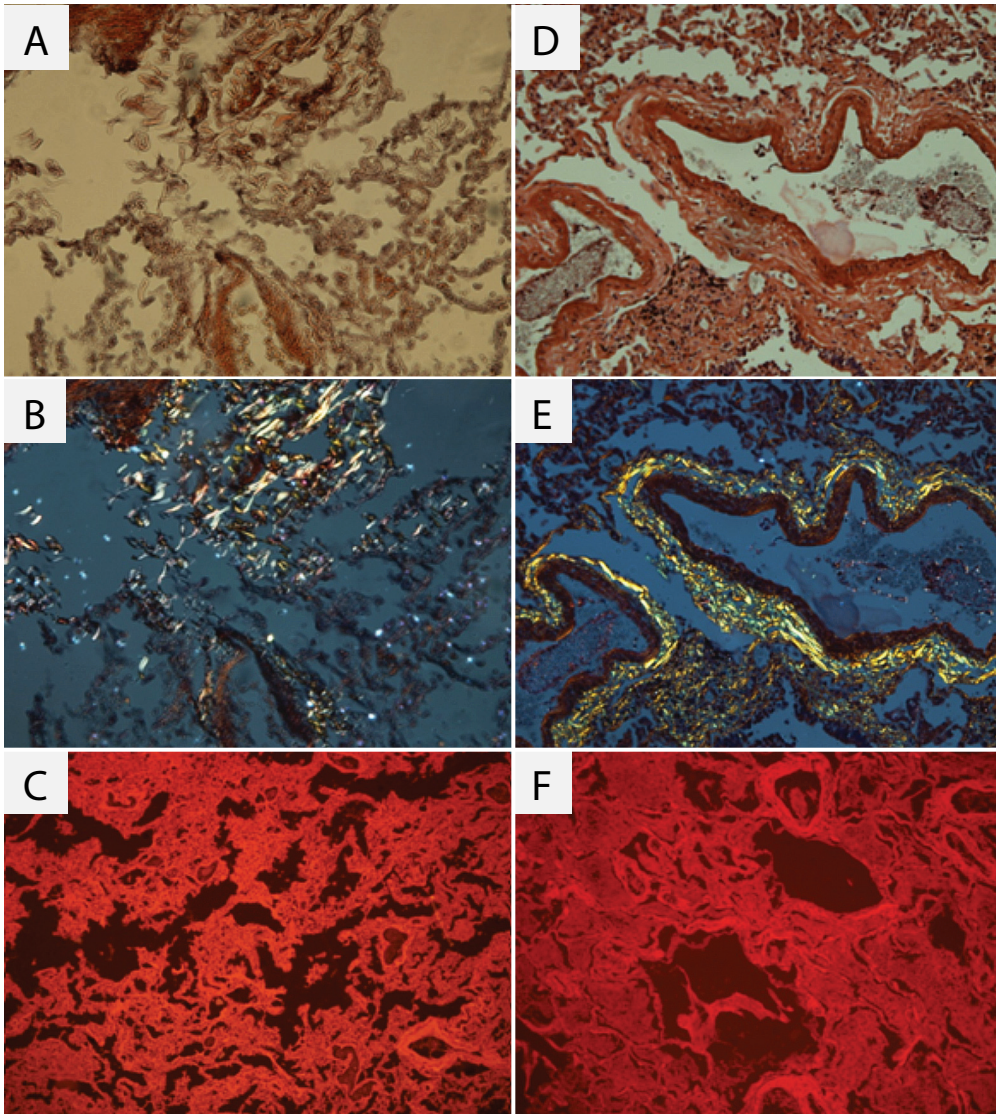


Рис. 5 / Fig. 5. Препарати легень осіб, що померли внаслідок обумовленого COVID-19 фіброзу: A, D – світлова мікроскопія; B, E – поляризаційна мікроскопія; C, F – люмінесцентна мікроскопія. Конго червоний. $\times 200$ / Lung preparations of persons who died as a result of COVID-19-induced fibrosis: A, D – light microscopy; B, E – polarization microscopy; C, F – fluorescence microscopy. Congo red. $\times 200$.

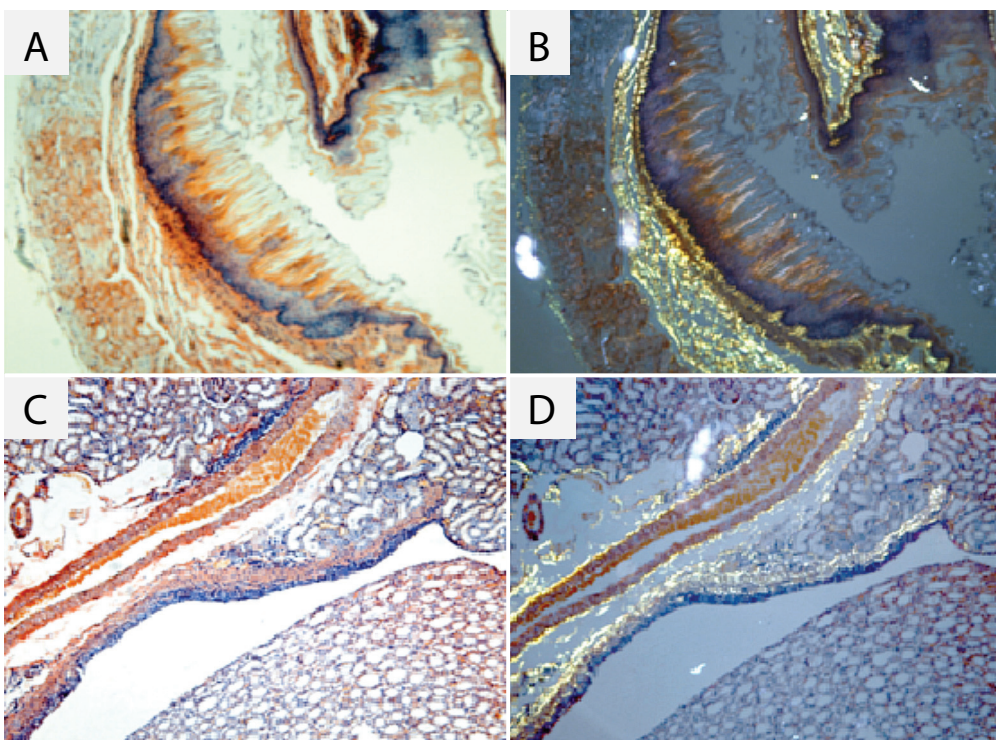


Рис. 6 / Fig. 6. Зразки тканин піддослідних щурів після інтоксикації доксорубіцином. Аорта в світловому (A) та поляризаційному (B) мікроскопах; нирки у світловому (C) та поляризаційному (D) мікроскопах. Конго червоний. $\times 200$ / Tissue samples of experimental rats after doxorubicin intoxication. Aorta in light (A) and polarization (B) microscopes; kidneys in light (C) and polarization (D) microscopes. Congo red. $\times 200$.

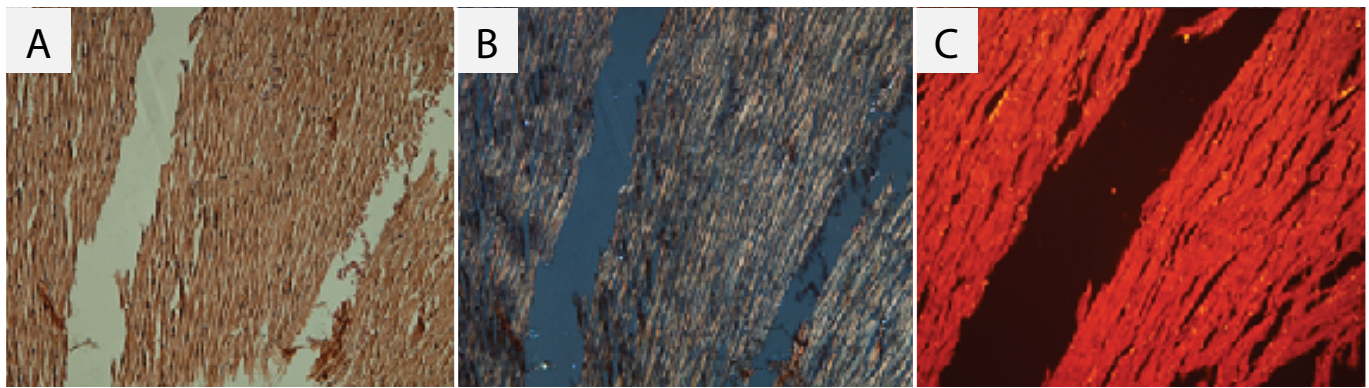


Рис. 7 / Fig. 7. Зразки тканин міокарду піддослідних щурів після інтоксикації доксорубіцином у світловому (А), поляризаційному (В) та люмінесцентному (С) мікроскопах. Конго червоний. $\times 200$ / Preparations of myocardial tissues from experimental rats after doxorubicin intoxication in light (A), polarization (B) and fluorescent (C) microscopes. Congo red. $\times 200$.

ВИСНОВКИ

Отримані експериментальні дані дозволяють припустити загальну та невід'ємну участь β -структурованих білкових агрегатів у формуванні різних за етіологією фіброзних тканин. Показано присутність цих депозитів у фіброзних тканинах, утворених внаслідок локального хронічного запалення, вірусного інфікування та побічної дії цитостатика

доксорубіцину. Обговорюється провідна роль порушення білкового гомеостазу і локального накопичення структурно ушкоджених білків як передумови до автохтонного агрегаційного процесу. Показано доцільність застосування люмінесцентної мікроскопії, що істотно розширює можливості виявлення за допомогою Конго червоного нанорозмірних β -структурованих білкових агрегатів, невидимих через обмеження Аббе у світловій та поляризаційній мікроскопії.



СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ / REFERENCES

- Wynn T, Ramalingam T. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med.* 2012;18(7):1028-40. DOI: 10.1038/nm.2807.
- Ogawa R. Keloid and hypertrophic scars are the result of chronic inflammation in the reticular dermatitis. *Int J Mol Sci.* 2017;18(3):606-15. DOI:10.3390/ijms18030606.PMID: 28287424
- Wolfram D, Tzanko W, Pulzi P, Piza-Katzer H. Hypertrophic scars and keloids – A review of their pathophysiology, risk factors, and therapeutic management. *Dermatol Surg.* 2009;35(2):171-81. DOI:10.1111/j.1524-4725.2008.34406.x
- Hinderer S, Schenke-Layland K. Cardiac fibrosis – A short review of causes and therapeutic strategies. *Adv Drug Deliv Rev.* 2019;146:77-82. DOI:10.1016/j.addr.2019.05.011.
- Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol.* 2008;214(2):199-210. DOI:10.1002/path.2277
- Ziablytsev S, Elskyy V. [Stage of endogenous intoxication syndrome in experimental brain injury]. *Trauma.* 2019;20(4):80-7. Ukrainian. DOI: 10.22141/1608-1706.4.20.2019.178750
- Sidel'nikova VI, Chernitskiy AE, Retsky MI. [Endogenous intoxication and inflammation: reaction sequence and informativity of the markers (review)]. *Agricultural Biology.* 2015;50(2):152-61. Russian. DOI:10.15389/agrobiol.2015.2.152eng
- Jahn T, Radford S. The Yin and Yang of protein folding. *FEBS J.* 2005;272(23):5962-70. DOI:10.1111/j.1742-4658.2005.05021.x
- Zabolotnyi DI, Belousova AA, Zaritskaya IS, Verevka SV. [Autochthonic β -aggregation of proteins: cause, molecular mechanisms, and pathologic consequences]. *Journal of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine.* 2014;24:385-92. Ukrainian.
- Sideras K, Gertz M. Amyloidosis. *Adv Clin Chem.* 2009;47:1-44. PMID: 19634775
- Buxbaum J, Linke R. A molecular history of the amyloidosis. *J Mol Biol.* 2012;421(2-3):142-59. DOI: 10.1016/j.jmb.2012.01.024.
- Zabolotnyi DI, Belousova AA, Zabolotna DD, Savchenko TD, Voroshylova NM, Timchenko MD, Tsvirinko IR, Verevka SV. Aggregated proteins in malignant and benign neoplasms. *Exp Oncol.* 2019;41(1):61-8. DOI:10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-41-no-1.12629
- Brigger D, Muckle T. Comparison of Sirius red and Congo red as stains for amyloid in animal tissues. *J Histochem Cytochem.* 1975;23(1):84-8. DOI:10.1177/23.1.46874. PMID: 46874
- Puchtler H, Sweat F, Levine M. On the binding of Congo red by amyloid. *J Histochem Cytochem.* 1962;10:355-64. DOI:10.1177/10.3.355
- Harris JR, editor. Protein aggregation and fibrillogenesis in cerebral and systemic amyloid disease. Springer Science @ Business Media; 2012. 650 p.
- Khurana R, Uversky V, Nielsen L, Fink A. Is Congo red an amyloid-specific dye? *J Biol Chem.* 2001;276(25):22715-21. DOI:10.1074/jbc.M011499200
- Sapozhnikov SP, Karyshev PB, Sheptuhina AI, Nikolayeva OV, Avruyskaya AA, Mitrasov YN, Kozlov VA. [Novel fluorescent probes for amyloid detection]. *Sovremennye Tehnologii v Medicine.* 2017;9(2):91-8. Russian. DOI:10.17691/stm2017.9.2.11
- Hobbs J, Morgan A. Fluorescence microscopy with thioflavin-T in the diagnostics of amyloid. *J Pathol Bacteriol.* 1963;86:437-42. DOI:10.1002/path.1700860218
- Merkulov GA. [Course of pathohistologic techniques]. Leningrad: Medicina; 1969. 424 p. Russian.
- Karsdal M, Nielsen S, Leeming D, Langholm L, Langholm LL, Nielsen MJ, Manon-Jensen T et al. The good and the bad collagens of fibrosis – Their role in signaling and organ function. *Adv Drug Deliv Rev.* 2017;121:43-56. DOI: 10.1016/j.addr.2017.07.014
- Eanes E, Glenner G. X-ray diffraction studies of amyloid filaments. *J Histochem Cytochem.* 1968;16(1):673-7. DOI:10.1177/16.11.673
- Kravkov NP. [About amyloid, artificially induced in animals]. *Vrach.* 1894;30:837-40. Russian.
- Hurzenko YuM. [Fibroplastic induration of the penis]. Kyiv; 2004. 383 p. Ukrainian.
- Verevka SV. Parametabolic β -aggregation of proteins: familiar mechanisms with diverse sequels. In: Berhardt LV, editor. *Advances in medicine and biology.* NY: Nova Science Publishers; 2013. Vol. 72. pp. 29-48.

Iba T, Connors JM, Levy JH. The coagulopathy, endotheliopathy, and vasculitis of COVID-19. *Inflamm Res.* 2020;69(12):1181-9. DOI:10.1007/s00011-020-01401-6.

25. Gordienko A, Babets YaV, Kulnich AO, Shevtsova AI, Ushakova GO. Activity of trypsin-like enzymes and gelatinases in the rats with doxorubicin cardiomyopathy. *Ukr Biochem J.* 2014;86(6):139-46. DOI: http://dx.doi.org/10.15407/ubj86.06.139.

26. Gordijenko IA, Poslavska OV, Shevtsova AI. Impact of corvutin and alpha-ketoglutarate on heart morphology, expression and activity of matrix metalloproteinases 2/9 in the heart of rats with doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Regul Mech Biosyst.* 2019;10(4):372-81.

27. Voroshylova NM, Timchenko MD, Verevka SV. Bence-Jones protein as a form of nano-scaled β -stacked supramolecular aggregates. *Ukr J Nephrol Dial.* 2019;4(60):39-44. DOI:10.31450/ukrjnd.1(61).2019.05

28. Grobner T. Gadolinium – a specific trigger for the development of nephrogenic fibrosing dermopathy and nephrogenic systemic fibrosis? *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21(4):1104-8. DOI:10.1093/ndt/gfk062.PMID 16431890.

29. Wagner B, Drel V, Gorin Y. Pathophysiology of gadolinium-associated systemic fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2016;311(1):F1-F11. DOI:10.1152/ajprenal.00166.2016.



РЕЗЮМЕ

Фиброз: полиетиологическое осложнение с общим знаменателем

Д. И. Заболотный¹, Ю. В. Деева², Ю. Н. Гурженко³,
Д. Д. Заболотная¹, Ю. А. Гордиенко⁴,
М. Д. Тимченко¹, Н. М. Ворошилова¹,
С. В. Пакришень⁵, С. В. Веревка¹

¹ГУ «Институт отоларингологии им. проф. А. С. Коломийченко НАМН Украины», ул. Зоологическая, 3, Киев 03057, Украина

²Национальный медицинский университет им. А. А. Богомольца, бульвар Тараса Шевченка, 13, Киев 01601, Украина

³ДУ «Институт урологии НАМН Украины», ул. Владимира Винниченко, 9а, Киев 04053, Украина

⁴Днепропетровский государственный медицинский университет, ул. Владимира Вернадского, 9, Днепр 49044, Украина

⁵КНП «Александровская клиническая больница г. Киева», ул. Шелковичная, 39/1, Киев 01601, Украина

Состояние проблемы. Разрастание фиброзной соединительной ткани является распространенным осложнением разнообразных патологических процессов, существенно осложняющим выздоровление и составляющим одну из ведущих причин смертности. Несмотря на многолетние исследования, процесс развития фиброза остается недостаточно изученным и содержит множество «белых пятен». Фиброзу присущи непредсказуемость возникновения, склонность к разрастанию и низкая степень замещения нормальной соединительной тканью. Не меньшего внимания заслуживают и сама структура фиброзной ткани, ее отличия от нормальной и причины возникновения этих отличий. При этом формированию фиброзной ткани предшествует процесс эндогенной интоксикации – образование и накопление разнообразных аномальных метаболитов. Среди последних существенная роль принадлежит белкам и пептидам, чья структура претерпела повреждение и дестабилизацию. Известно, что дестабилизированные белки склонны к агрегации. Вопреки распространенному мнению, этот процесс протекает не хаотически, но подвержен закономерностям и направлен в сторону минимизации свободной энергии. В отношении последнего безусловным фаворитом является образование β -структурированных фибрилл, занимающих низший энергетический уровень белковых конформационных состояний. Подобные фибриллы отличаются нерастворимостью, устойчивостью к протеолизу, иммуно-

генностью и способностью к аутохтонному разрастанию за счет сорбции и конформационной перестройки растворенных белков. Классическим примером подобной агрегации является образование амилоидов, однако существуют весомые предпосылки для предположения о протекании подобных процессов при образовании других патологических тканей.

Цель работы состояла в экспериментальной проверке присутствия β -структурированных белковых агрегатов в составе фиброзных тканей разной этиологии.

Методическая часть включала отбор операционного материала, его фиксацию в 10 % растворе формальдегида, приготовление окрашенных Конго красным гистологических препаратов и микроскопическое их исследование в световом, поляризационном и люминесцентном режимах.

Результаты. Экспериментально доказано присутствие β -структурированных белковых агрегатов в фиброзных тканях, образовавшихся вследствие локального хронического воспаления, вирусной инфекции и побочного действия медикаментозных препаратов. Обнаруженное явление позволяет приблизиться к пониманию механизмов развития фиброза и постулировать положение о ключевой роли в этом процессе регулярной агрегации дестабилизированных белков.

Выводы. Полученные экспериментальные данные позволяют предположить общее и неотъемлемое участие β -структурированных белковых агрегатов в формировании различных по этиологии фиброзных тканей. Показано присутствие подобных депозитов в фиброзных тканях, образовавшихся вследствие локального хронического воспаления, вирусной инфекции и побочного действия цитостатика доксорубина. Обсуждается ведущая роль нарушения белкового гомеостаза и локального накопления структурно поврежденных белков как предпосылки для аутохтонного агрегационного процесса. Показано целесообразность применения люминесцентной микроскопии, существенно расширяющей возможности выявления при помощи Конго красного наноразмерных β -структурированных белковых агрегатов, невидимых из-за ограничения Аббе в световой и поляризационной микроскопии.

Ключевые слова: фиброз, келоидоз, болезнь Пейрони, COVID-19, цитостатики, наночастицы.

Для цитирования: Заболотный ДИ, Деева ЮВ, Гурженко ЮН, Заболотная ДД, Гордиенко ЮА, Тимченко МД, Ворошилова НМ, Пакришень СВ, Веревка СВ. Фиброз: полиетиологическое осложнение с общим знаменателем. *Журнал Национальной академии медицинских наук Украины.* 2021;27(2):90–99. DOI: 10.37621/JNAMSU-2021-2-3.

Статья поступила в редакцию 07.07.2021 | Направлена на рецензирование 07.07.2021 | Принята в печать 15.07.2021