

**БОШ МИЯДА ҚОН АЙЛАНИШИНИ ЎТКИР БУЗИЛИШЛАРИДА
ИММУНОГИСТОКИМЁВИЙ УСУЛДА КИ 67 МАРКЕРИ ОРҚАЛИ
ТЕКШИРИШДА ЖИГАРДА ЮЗАГА КЕЛАДИГАН ЎЗГАРИШЛАР**

Холбоева Гулноз Бахадировна.

*Шахар тез тиббий ёрдам клиник шифохонаси. Шифокор анестезиолог
реаниматолог, тел: 99-802-94-53. Email: xolboevy@mail.ru*

Резюме: Кі 67 маркери, гепатоцитларда пролифератив индексни аниқлашда, ҳар қандай хужайралар перинуклеар соҳасида экспрессияланиши билан намоён бўлиб, пролифератив фаолликни белгиловчи маркер ҳисобланади. Бу эса, айнан, гепатоцитлар ва фибробластларни пролифератив индексини баҳолашда муҳим рол ўйнайди. Иммуногистокимёвий текширишда қўлланилган маркерларнинг аҳамияти қуйидагича, Кі67 маркери хужайралар пролифера-циясини белгиловчи, маркер бўлиб, хужайранинг барча фаол даврларида G_1 , S , G_2 , M турлича (оч, ўрта ва кучли жигар рангда) даражада экспрессияланади. Хужайра фаоллашуви дастлабки фазаси G_1 дан M фазасигача бу маркер юқори экспрессияланиб, митознинг метафазасида яққол тасвирланади. G_1 дастлабки фазасида Кі-67 маркер сателлит ДНКнинг центрамида ва хромосоманинг теломерида жойлашади.

Калит сўзлар: иммуногистокимёвий усул, жигар, бош мия да ўткир қон айланишини бузилиши, эксперимент.

**ИЗМЕНЕНИЯ В ПЕЧЕНИ, ВОЗНИКАЮЩИЕ ПРИ ОСТРОМ
НАРУШЕНИИ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ, ВЫЯВЛЕННЫЕ
МЕТОДОМ ИММУНОГИСТОХИМИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАРКЕРА КИ-
67.**

Холбоева Гулноз Бахадировна

*Врач-анестезиолог-реаниматолог, Городская клиническая больница скорой
медицинской помощи.*

Телефон: +998 99 802 94 53 E-mail: xolboevy@mail.ru

Резюме: Маркер Кі-67 применяется для определения пролиферативного индекса гепатоцитов. Он экспрессируется в перинуклеарной области различных клеток и служит надёжным показателем пролиферативной активности. Это делает его особенно важным в оценке пролиферативного статуса гепатоцитов и

фибробластов. Значимость используемых в иммуногистохимическом исследовании маркеров проявляется, в частности, в том, что Ki-67 экспрессируется во всех активных фазах клеточного цикла (G1, S, G2, M) с различной степенью окрашивания (от слабого до интенсивного коричневого цвета). На ранней стадии клеточной активации — от фазы G1 до M — наблюдается высокая экспрессия Ki-67, с особенно чёткой визуализацией в метафазе митоза. В начальной фазе G1 маркер локализуется в центромерной области сателлитной ДНК и на теломерах хромосом.

Ключевые слова: иммуногистохимический метод, печень, острое нарушение мозгового кровообращения, эксперимент.

LIVER CHANGES IN ACUTE CEREBRAL CIRCULATORY DISORDERS IDENTIFIED BY IMMUNOHISTOCHEMICAL METHOD USING KI-67 MARKER

Gulnoz Bakhadirova Xolboeva

Anesthesiologist-Resuscitator, City Clinical Emergency Medical Hospital

Phone: +998 99 802 94 53 E-mail: xolboevy@mail.ru

Resume: The Ki-67 marker is used to determine the proliferative index of hepatocytes. It is expressed in the perinuclear region of various cells and serves as a reliable indicator of proliferative activity. This makes it particularly important for assessing the proliferative status of hepatocytes and fibroblasts. The significance of the markers used in immunohistochemical studies lies, in particular, in the fact that Ki-67 is expressed in all active phases of the cell cycle (G1, S, G2, M) with varying degrees of staining intensity (ranging from weak to strong brown coloration). During the early stages of cellular activation — from phase G1 to M — Ki-67 shows high expression, with especially clear visualization in the metaphase of mitosis. In the initial G1 phase, the marker is localized in the centromeric region of satellite DNA and at the telomeres of chromosomes.

Keywords: immunohistochemical method, liver, acute cerebral circulation disorder, experiment.

Долзарблилиги

Дунёда ҳозирги кунга келиб, жигар етишмовчилиги ҳар доим инсулт пайтида огир орган етишмовчилиги ёки тусатдан улимнинг асосий сабаби булиб келган. Аммо яқин кунларгача БМКАУБ ва жигар етишмовчилиги айниқса долзарб муаммо булиб келган. Энг сунгги йирик халқаро тадқиқотларга кура (STONE, Syst-Eur, NICS), БМКАУБ ва миокард инфаркти юрак-кон томир патологияларининг тахминан 30

фоизидан устунлик қилган. Дунёда ҳар йили 30 млндан ортиқ БМКАЎБ ва жигар етишмовчилиги ҳолатлари қайд этилади. Жигар етишмовчилиги ва қон томир фалокатининг куплаб сабаблари мавжуд. У катта ва кичик томирларнинг турли патологик шароитларига, тизимли қон оқими ва қон оқимининг бузилишига асосланган. Жигар инсон танасининг ноёб органларидан биридир. Бу инсон танасидаги биокимёвий лабораторияга тенг.

Жигарнинг шикастланиш белгилари бош мияда ўткир қон айланишини бузилишидан кейинги даврда юзага келиши, асосан, меҳнатга лаёқатли контингентларнинг ўртача 45-65 ёшлилар орасида энг кўп учраши, оқибатида, меҳнатга лаёқатсизлик кўрсаткичи, дастлабки 1-3 ойликда 91,6% ни тақшил этса, маълум вақт давомида, 3-12 ойда бу кўрсаткич, 78,11% ни ташкил этади.

Бу эса, беморларни парваришлаш ва боқимандалик эҳтиёжини юзага келишга олиб келади. Беморларнинг 3-8%да реабилитация баврида касалликни оғир асосратлари сабабли летал кўрсаткичларга олиб келиши, клиник морфологик жиҳатдан беморларда бош мия фаолиятини қайта тикланиши индивидуал тарзда кечиши сабабли аниқ ташхислаш ва даволаш мезонларининг мавжуд эмаслиги орқали, муаммони долзарблигини тақозо этади.

Натижа ва муҳокамка. БМҚАЎБ фонида жигар тўқимасида юзага келадиган ўзгариш-ларнинг туб моҳиятини ўрганишда иммуногистокимёвий текширишда Кі 67, P53, Bcl-2, маркерларидан фойдаланилди. Ушбу маркерлар орқали жигар тўқимасидаги ўзгаришларни ҳар бир маркер йўналишида ўрганишдан иборат.

Қўлланилган моноклонал антитаначалар ёрдамида парафинга солинган материалларни стандарт усуллар ёрдамида иммуногистокимёвий бўйаш ўтказилди. Парафинли блоклардан 3-5мм қалинликдаги кесмалар тайёрланиб, буюм ойнасига олинди ва хона ҳароратида бир кун давомида қуритилади. Бўйашдан олдин кесмалар вертикал ҳолатда 55⁰С ҳароратга 60 дақиқага термостатга қўйилади. Шундан кейин орто-ксилолда депарафинизация қилинади (иккита ҳажмли батареяларда ҳар бирида 10 дақиқадан), камайиб боровчи концентрациядаги этил спиртида регидротацияланади (уч ҳажмли батареяларда ҳар бирида 3 дақиқадан) ва дистилланган сувда ювилади. Кесма олинган буюм ойнаси қиздирилиб, демаскирланган буферга олинади ва 98⁰С ҳароратда 30-40 дақиқага сувли баняга қўйилади.

Эслатиб ўтамиз, иммуногистокимёвий текшириш орқали биз жигардаги некроз, некроз олди жараёни, пролифератив кўрсаткичлар, кейин жигардаги қон томирларнинг фаоллигини аниқлаш мақсади ҳам қўйилди.

Иммуногистохимёвий тадқиқотда моноклонал антителолар ва тизимли визуализация тизими (Ventana Ultra USA) ёрдамида амалга оширилди:

1. P 53 гепатоцитларда апоптозни стимуллайдиган ген.

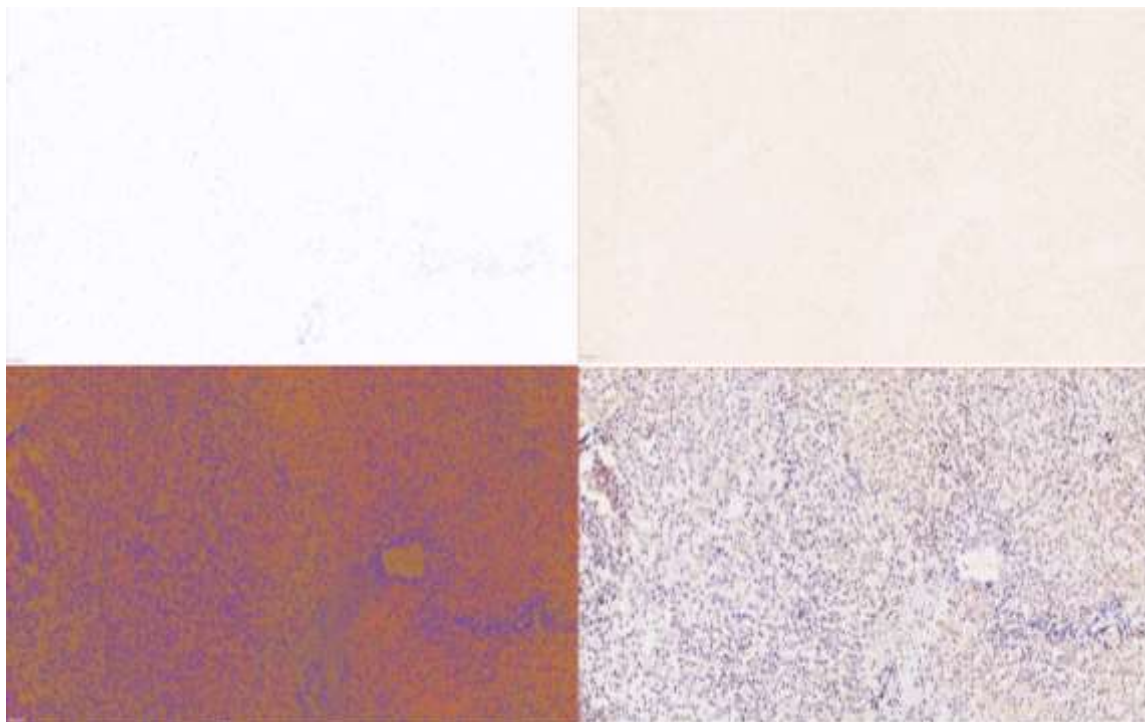
2. Ki 67 хужайраларни пролифератив индексни белгиловчи омил.

3. Bcl2 апоптозга қарши ишловчи ген бўлиб, хужайралар митохон-дриялари атрофида ва цитоплазмада эркин жойлашади.

Ki 67 маркери, гепатоцитларда пролифератив индексни аниқлашда, ҳар қандай хужайралар перинуклеар соҳасида экспрессияланиши билан намоён бўлиб, пролифератив фаолликни белгиловчи маркер ҳисобланади. Бу эса, айнан, гепатоцитлар ва фибробластларни пролифератив индексини баҳолашда муҳим рол ўйнайди. Иммуногистохимёвий текширишда қўлланилган маркерларнинг аҳамияти куйидагича, Ki67 маркери хужайралар пролифера-циясини белгиловчи, маркер бўлиб, хужайранинг барча фаол даврларида G_1 , S, G_2 , M турлича (оч, ўрта ва кучли жигар рангда) даражада экспрессияланади. Хужайра фаоллашуви дастлабки фазаси G_1 дан M фазасигача бу маркер юқори экспрессияланиб, митознинг метафазасида яққол тасвирланади. G_1 дастлабки фазасида Ki-67 маркер сателлит ДНКнинг центрамида ва хромосоманинг теломерида жойлашади.

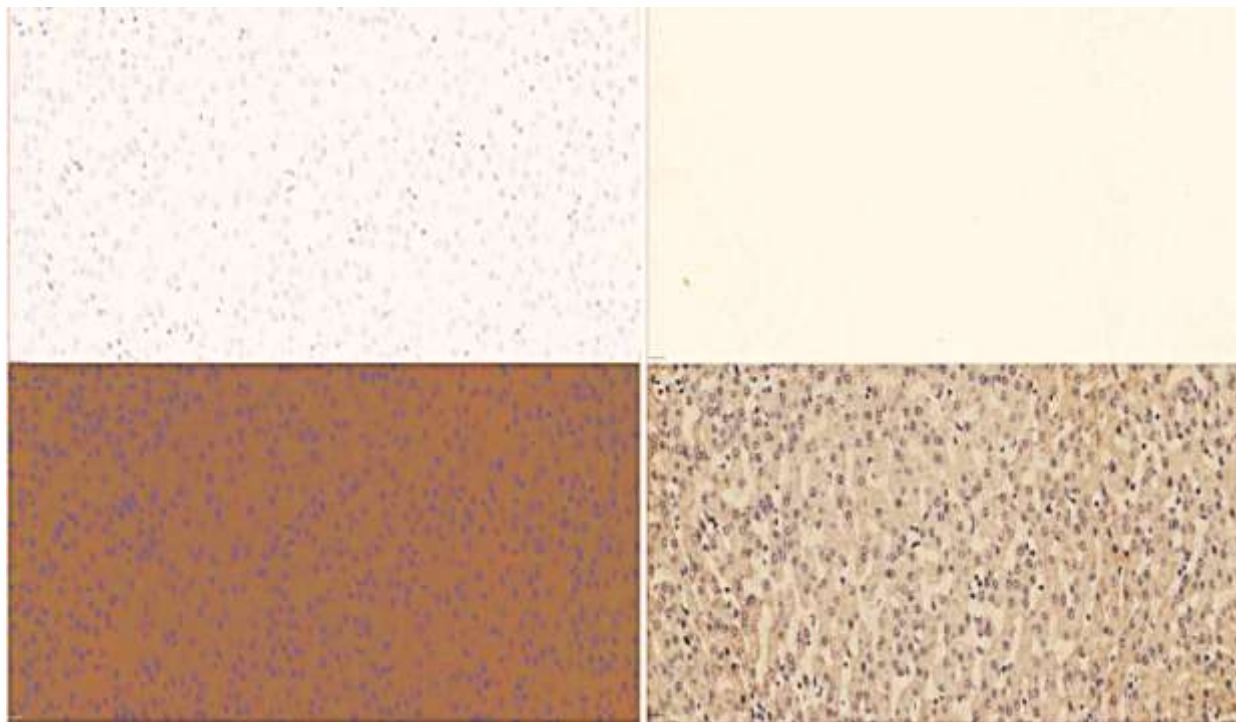
Ki-67 маркери асосида хужайралар пролиферацияланиш индексини ҳисоблаш мумкин. Ҳисоблашда жами 500 та хужайралар саналиб, улардан нечтасининг ядросида бу маркер мусбат даражада экспрессияланганлиги аниқланиб, барча хужайраларнинг неча фоизида мусбатлиги ҳисобланади (6). 1) 10% - паст даражадаги, 2) 10-20% - ўрта даражадаги, 3) 20% кўп бўлса юқори даражадаги экспрессияланиш деб баҳоланади.

Хужайра фаоллашувининг ўрта фазаларида Ki-67 маркер интрануклеар кўринишда ядрода аниқланса, G_2 -фазасига келиб, ядрода ва кариоплазмада экспрессияланади. Хужайра митоздан кейинги G_0 га ўтганда Ki-67 маркер протеосомалар ёрдамида деградиацияланиб, тўлиқ катаболизмга учрайди ва интерфазадаги хужайраларда экспрессияланмайди. Бу эса, айтилган тадқиқот ишимизда, жигарда пролифератив фаол бўлган гепатоцитлар ва фибробластларни пролифератив индексини баҳолашда, муҳим ҳисобланади.



1-расм БМЎҚАБда жигардаги ўзгаришлар 15 сутка. Кі 67 маркерининг юқори позитив экспрессияси. Кі 67 маркерининг юқори позитив экспрессияси. QuPath-0.4.0.ink. дастурида сканер қилинган ва экспрессияланиш даражаси аниқланган. Экспрессияланган хужайралар тўқ қизил рангда. Бўёқ Даб хромоген. Ўлчами 10X10.

Юқорида келтирилган иммуногистохимёвий текширишларда олинган микронамуналарда паст позитив экспрессияда даб – хромоген бўёқ маскировкасини интенсивлик даражасини аниқлаш ақсадида, махсу дастур бўлган QuPath-0.4.0.ink. фазаконтрастли фонида текширилди. Хар бир фазаконтарстли фонда бўялиш интенсивлигини ишонарли жихатларини юқори аниқликда намоён бўлиши келтирилган (1,2- расмларга қаранг). Бу каби дизайнда ИГХ текширувларини микронамуналардан олинган микротасвирлар орқали солиштирима кўринишда келтирилган бўлиб, юқори аниқликда келтирилган. Тадқиқот ишимизда, гурухлар (даволанганларда кўрсаткичлар бир бирига якин) ўрганилаётганларни 73,02% да Кі-67 маркерининг юқори позитив экспрессияси асосан, гепатоцитларда аниқланиб, мезенхимал хужайраларда жуда паст кўрсатичли реакциялар билан намоён бўлди. Бу эса, жигар паренхимасида, мултифокал некроз ўчоқларини фаоллашганлигини ва копенсатор репаратив регенератор кўрсаткичларни юқори даражада кечаётганлигини англатади.



2-расм БМЎҚАБда жигардаги ўзгаришлар 15 сутка. Ki 67 маркерининг юқори позитив экспрессияси. Ki 67 маркерининг юқори позитив экспрессияси. QuPath-0.4.0.ink. дастурида сканер қилинган ва экспрессияланиш даражаси аниқланган. Экспрессияланган хужайралар тўқ қизил рангда. Бўёқ Даб хромоген. Ўлчами 10X10.

1-Жадвал.

Ki-67 – маркерининг экспрессияланиш даражаси. Ушбу фоиз кўрсаткич-лари QuPath-0.4.0.ink суъний интеллект билан дастурланган таъминотида юқори аниқликда келтирилган.

Рецепторлар	Паст экспрессия (1 балл)	Ўрта экспрессия (2 балл)	Юқори экспрессия (3 балл)	Негат ив реакция (0 балл)
3 кунлик даволангмаган	6,81%	-	-	93,19 %
3 кунлик даволанган Сукцина соль ва Бифидумлактобактерин	7,84%	-	-	92,16 %
7 кунлик даволангмаган	6,16%	-	-	93,84

				%
7 кунлик даволанган Сукцинасоль ва Бифидумлактобактерин	8,76%	-	-	91,24 %
15 кунлик даволангмаган	8,8%	1,83%	1,98%	87,39 %
15 кунлик даволанган Сукцинасоль ва Бифидумлактобактерин	6,91%	1,22%	1,66%	90,21 %
30 кунлик даволангмаган	6,57%	4,94%	1,63%	86,86 %
30 кунлик даволанган Сукцинасоль ва Бифидумлактобактерин	3,7%	8,66%	1,16%	86,48 %

Каламушлар жигарида 2 ва 3-ядроли митоз фазаси кечаётган гепатоцитларни кўплиги, ҳажм жиҳатдан жигарни тўлиқ эгаллаётган гепатоцитларни кўплиги, детоксикацияловчи фаолияти билан бевосита боғлиқ бўлиб, айнан, **БМЎҚАБда** ушбу морфофункционал кўрсаткичларни иммуногистохимёвий жиҳатлари, гепатоцитларда меёрдан орқада қолаётган-лигини англаатди.

Тадқиқотимизда, ўрганилаётган ва даволанмаган гурухнинг 15 суткасида жигарнинг паренхимасида (гепатоцитларида) пролифератив кўрсаткич 6,81 % ни ташкил этган бўлса, мезенхимал хужайраларда 8,01%да юқори позитив экспрессия аниқланди. Қолган 6,16-8,8% атрофида паст позитив, 93,19-90,21% да негатив экспрессияланиш билан намоён бўлди.

Тадқиқотларнинг даволанган гурухларида 7,15-суткалик даврида каламушлар жигарида Ki-67 маркерининг реакцияси асосан паст позитив (8,76% атрофида) экспрессияда бўлиб, бу ҳолат, жигар гепатоцитларини кўпайиш бўйича стабил хужайралар бўлиб, 1-6 ой давомида митоз циклини давом этиши кўринишида бўлиб, айнан, тадқиқот ишини 7-15 суткаларида даволанмаган ва даволанган гурухларда пролифератив индексини ўртача 91,4% атрофида негатив реакция берганлиги билан намоён бўлди.

Ki-67 маркерининг реакцияси бўйича, 3,7,15 суткаларда гепатоцитларда паст позитив экспрессияни инобатга олиб гепатоцитларнинг пролифератив индекси, ўртача $7,01 \pm 0,15\%$ ни ташкил этганлиги аниқланди. Мезенхимал хужайраларда пролифератив индекс, $6,01 \pm 0,01\%$ ни ташкил этиб, статистик жиҳатдан бу кўрсаткич,

назорат гурухидаги кўрсаткичлардан деарлик фарқ қилмаганлиги ва таққослама солиштиришлар бир бирига яқин бўлганлиги учун кам ахамиятлилиги аниқланди.

Демак, БМЎҚАБда жигар гепатоцитларида Ki-67 маркерининг реакцияси 3,7,15 суткалик даврда кескин пролиферация бўлмаслиги ва бу ҳолат, гепатоцитларни пролифератив кўрсаткичи бўйича, стабил хужайралар (1-6 ой давомида митоз циклини сақланиб туриши) туркумига кириши билан изоҳалинб, жигарда асосан шикастланиш ва апоптоз жараёнини устунлиги юзага келганлиги учун ҳам пролифератив кўрсаткичлари паст ва негатив реакциялар билан намоён бўлди.

БМЎҚАБнинг 30 суткаси Ki-67 маркерининг экспрессияланиши асосан гепатоцитларда нисбатан ўрта позитив реакцияси даволанмаган гуруҳ каламушлари жигарида 4,94-8,66% ни ташкил этса, даволанган ҳар иккала гуруҳда Ki-67 маркерининг ўрта позитив экспрессияси 8,66% ни ташкил этиб, бу ҳам ўз навбатида, паст позитив реакцияси берганлиги билан намоён бўлди. Ушбу Ki-67 маркерининг экспрессияланиш кўрсаткичи даволанган 2 ла гуруҳдаги кўрсаткичлари бўйича, бир бирига жуда яқин бўлиб, статистик ахамиятлик кўрсаткичи бўйича ядро экспрессияси кўрсаткичи ахамиятсиз деб қабул қилинди. Бу эса, Ki-67 маркерининг асосан гепатоцитларда, тажрибанинг 30-суткалик даврида 10% гачам яъни паст кўрсаткичлар билан реакция берганлиги орқали маълум бўлди.

Мезенхимал хужайралар бўйича, асосан триадалар, перилобуляр ва перидуктал соҳалардаги фибробластлар, гистиоцитлар ва бошқа мезенхимал хужайраларда пролифератив фаолликни нисбатан юқори бўлиши бўйича пролифератив индекси ўртача $11,65 \pm 0,15\%$ ни ташкил этса, жигар паренхима-сини ташкил этган гепатоцитларда пролифератив индекс $8,01 \pm 0,01\%$ ни ташкил этганлиги аниқланади. Бу эса, ўз навбатида, бош миёда қон айланишини ўткир бузилиши, жигарда пролифератив кўрсаткичлар эмас, балки, гепатоцитларда давомли шикастланиш жараёни давомли кечаётган-лиги ва шу билан бирга мезенхимал хужайраларда ҳам паст позитив реакция кўринишида пролифератив фаоллик кечаётганлигини англатади.

ФОЙДАЛАНИЛГАН АДАБИЁТЛАР

1.Абрашова Т.В. и др. Вариабельность биохимических и гематоло-гических показателей у лабораторных крыс в зависимости от линии и возраста (Сообщение 1) //Международный вестник ветеринарии. – 2010.№. 2.С. 55-60.

2.Громова Н.И. Роль хронических вирусных гепатитов в формировании цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы // Инфектология. 2012. № 1. С. 37–44.

3. Жданов К.В., Гусев Д.А., Захаренко С.М. и др. Дисбиоз кишечника при циррозе печени // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2011. № 6. С. 38–44.

4. Иванов А.Г. Экспертиза качества жизни больных циррозом печени, осложненным печеночной энцефалопатией // Проблемы экспертизы в медицине. – 2005. – Т. 5. – №. 19-3. – С. 45-47.

5. Курбанова М.Г. Исследование и разработка полифункциональных добавок на основе гидролизатов казеина и практическая реализация технологий пищевых продуктов с их использованием: дис. ... д-ра техн. наук: 05.18.04

6. Лебедев Л.Е., Лебедев Н. К., Цветкова Л. Я. Энтальпия полимеризации винилтриметилсилана.

7. Маев И. В. и др. Распространенность, патогенез и принципы лечения неалкогольной жировой болезни печени // Фарматека. – 2011. – Т. 12. С. 12-5.

8. Низов А.А., Ермачкова А.Н., Абросимов В.Н., Пономарева И.Б. Ведение больных ХОБЛ: роль оценки заболевания в реальной клинической практике – Текст (визуальный): непосредственный // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2018. – Т. 6, №3. – С. 429-438

9. Пестренин Л. Д., Булатова И. А., Гуляева И. Л. Активность сывороточных цитокинов и маркера повреждения эндотелия у пациентов со стеатозом, фиброзом и циррозом печени // Медико-фармацевтический журнал «Пульс». – 2017. – Т. 19. – №. 7. – С. 116-120.

10. Петров В. Н., Лапотников В. А. Цирроз печени // Российский семейный врач. – 2011. – Т. 15. – №. 3. – С. 46-51.

11. Van Vugt J. L. A. et al. Systematic review and meta-analysis of the impact of computed tomography-assessed skeletal muscle mass on outcome in patients awaiting or undergoing liver transplantation // American Journal of Transplantation. – 2016. – Т. 16. – №. 8. – С. 2277-2292.

12. Vincent J. L., De Backer D., Wiedermann C. J. Fluid management in sepsis: The potential beneficial effects of albumin // Journal of critical care. – 2016. – Т. 35. – С. 161-167.

13. Wang D. et al. Preoperative inflammatory markers of NLR and PLR as indicators of poor prognosis in resectable HCC // PeerJ. – 2019. – Т. 7. – С. e7132.

14. Who O. Traditional Medicine. Fact Sheet. 2007. no. 134, Revised May 2003

15. World Medical Association (2013). WMA Declaration of Helsinki – Ethical principles for medical research involving human subjects. Online. Retrieved 4 July 2021, from: <https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/>

16. World of Work Report 2013–Repairing the economic and social fabric. – 2013. - 133p.
17. Zhang M. et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio and albumin: new serum biomarkers to predict the prognosis of male alcoholic cirrhosis patients //BioMed Research International. – 2020. – T. 2020. – C. 1-7.
18. Zhao Y. et al. Early sorafenib-related adverse events predict therapy response of TACE plus sorafenib: A multicenter clinical study of 606 HCC patients //International journal of cancer. – 2016. – T. 139. – №. 4. – C. 928-937.
19. Tsien C. D., McCullough A. J., Dasarathy S. Late evening snack: exploiting a period of anabolic opportunity in cirrhosis //Journal of gastroenterology and hepatology. – 2012. – T. 27. – №. 3. – C. 430-441.
20. Tsukanov V. V. et al. Роль эрадикации *Helicobacter pylori* в профилактике рака желудка //Терапевтический архив. – 2014. – Т. 86. – №. 8. – С. 124-127.
21. Valerio C. et al. Human albumin solution for patients with cirrhosis and acute on chronic liver failure: Beyond simple volume expansion //World journal of hepatology. – 2016. – Т. 8. – №. 7. – С. 345.
- 22.