

ническую практику.

ЛИТЕРАТУРА

1. Петросян Э.А., Каде А.Х., Петровский А.Н. и др. // Эфферентная терапия. – 2000. – Т. 6, № 3. – С. 62–67.

Emelyanov D.N., Sviridenko O.Yu., Statrenko I.Yu., Myasyn R.G., Tumarenko A.V. Modern medicinal and non-medicinal methods of treating chronic diffuse liver diseases // Vestnik of Volgograd State Medical University. – 2005. – № 3(15). – P. 56–58.

107 patients with chronic diffuse liver diseases were given infusions of sodium-hypochlorite and 142 patients were treated with the help of transcranial electrostimulation. The levels of lipid peroxidation and antioxidative enzymes activity, liver-specific enzymes and intrahepatic hemodynamics were determined before and after the therapy courses. The treatment revealed positive dynamics of all indices. Therefore, the treatment with sodium-hypochlorite and transcranial electrostimulation are new, effective medicinal and non-medicinal methods in patients with chronic diffuse liver diseases.

2. Лебедев В.П., Рычкова С.В., Мелихова М.В. Экспериментальное обоснование применения транскраниальной электростимуляции эндорфинных систем мозга в гастроэнтерологии. – Санкт-Петербург: Гастро-99. – С. 327.

УДК 616.31:681

ДИФFUЗНАЯ ЭНДОКРИННАЯ СИСТЕМА И НАРУШЕНИЕ ПРОЦЕССОВ КЛЕТОЧНОГО ОБНОВЛЕНИЯ КОЛОНОЦИТОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СТЕПЕНЯХ ТЯЖЕСТИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ЯЗВЕННОГО КОЛИТА

А.М. Осадчук, В.Т. Ивашкин

Самарский военно-медицинский институт, Московская медицинская академия имени И.М. Сеченова

Увеличение частоты заболеваемости, непредсказуемость течения неспецифического язвенного колита (НЯК), преимущественное поражение лиц молодого возраста, дискутабельный характер основных этиопатогенетических факторов, наличие осложнений, опасных для жизни, обуславливает особую актуальность данной патологии [1].

В настоящее время полагают, что основные процессы повреждения кишечника и последующая малигнизация при НЯК связаны с нарушением регенерации и незавершенным апоптозом [2]. При этом течение процессов клеточного обновления эпителиоцитов регулируется циклин-зависимыми протеинкиназами и диффузной нейроэндокринной системой. Их изучение при НЯК может явиться основой для выявления ранних патогенетических, диагностических и прогностических признаков [5, 6, 7].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Выявить новые патогенетические механизмы возникновения и прогрессирования неспецифического язвенного колита и на основе изучения клеточного обновления эпителиоцитов кишечника и диффузной нейроэндокринной системы разработать новые диагностические и прогностические критерии течения данной патологии.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследовано 120 больных НЯК. Легкое течение НЯК диагностировалось у 40, течение средней тяжести у 40 и тяжелое течение заболевания у 40 больных. В основу разделения больных на группы по степеням тяжести НЯК легла классификация *Truelove* и *Witts* 1955 года с обновленными рекомендациями Г. Адлера (2001).

Группы сравнения составили 24 практически здоровых человека (1-я группа), 64 больных с синдромом раздраженного кишечника (СРК) 1-го типа без атрофических изменений слизистой оболочки толстой кишки (СОТК) (2-я группа), 64 больных (3-я группа) СРК 2-го типа с наличием атрофии слизистой оболочки толстой кишки. Верификация СРК базировалась на Римских критериях II (1999). Больные и здоровые обследовались по единой программе, включающей клинико-эндоскопическое, морфологическое, иммуногистохимическое и электронно-микроскопическое исследования. Больные НЯК были обследованы также в период ремиссии заболевания.

У всех обследованных при колоноскопии была взята биопсия слизистой оболочки средней трети сигмовидного отдела толстой кишки. После фиксации биопсийного материала депарафинированные срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином-эозином. Для выявления апоптотных ядер исследуемый материал импрегнировали по Мозеру (1995). Гибель клеток в форме апоптоза определяли по индексу апоптоза ($I_{АПТ}$) по формуле $I_{АПТ} (\%) = N$ (число апоптотных ядер, окрашенных по методу Мозера)/ N (общее число ядер) $\times 100$. С целью верификации пролиферирующего клеточного ядерного антигена [PCNA] использовали моноклональные антитела (клон PC10, Sigma, St. Louis, USA, титр 1:1000). Дефиниция циклина D_1 достигалась с помощью моноклональных антител (Novocastra, UK, титр 1:500).

Депарафинированные срезы инкубировались в течение ночи в фосфатно-солевом буфере (ФСБ, pH 7,2) при 40 °С. После промывки в ФСБ проводили блокаду эндогенной пероксидазы в 0,3 % растворе перекиси водорода в течение

(15)

30 мин, после чего опять промывали срезы в ФСБ 15 мин. Срезы покрывали одним из вышеуказанных первичных антител и инкубировали в течение 1 часа при температуре 37°C. После последнего промывания в ФСБ в течение 15 мин срезы покрывали вторыми антителами, конъюгированными с пероксидазой (Dako, Glostrup, Denmark, титр 1:250) и также инкубировали в течение 1 часа при 37°C. После промывания в ФСБ проявляли пероксидазу в течение 10 мин 3,3-диаминобензидином (Sigma, St. Louis, USA). Ядра клеток, давшие положительную иммуногистохимическую реакцию, (содержащие искомым маркер) окрашивались в коричневатый цвет.

Пролиферативную активность клеток определяли по пролиферативным показателям (индекс пролиферирующего клеточного ядерного антигена – I_{PCNA}, индекс циклина D₁ – I_{cykl-D₁}) по формуле:

I_{PCNA} (или $I_{cycl-D1}$ соответственно) (%) = N (количество ядер иммунопозитивных к PCNA или циклину D₁) / N (общее количество ядер) × 100, где N – количество ядер на 1 мм² площади среза. Подсчет индексов проводили в 10 полях зрения по трем срезам исследуемой биопсии. Тестовая площадь для определения индексов включала не менее 2000 клеточных ядер.

Аргентаффинный метод Массона использовали для верификации энтерохромаффинных клеток. Для выявления тучных клеток, после гидролиза соляной кислотой, применяли окраску толуидиновым синим (реакция "скрытой" метахромазии).

Имуногистохимический метод использовали для верификации определенных типов эндокринных клеток – апудоцитов. В качестве первичных антител применяли коммерческие антитела к хромогранину А (Dako, 1:50), серотонину (Dianova, 1:100), мелатонину (CID Res.Inc., 1:200).

Для подсчетов плотности ядер колоноцитов пользовались методикой Г.Г. Автандилова (1990). Высчитывался коэффициент плотности распределения ядер колоноцитов (K), представляющий собой отношение числа ядер в измененной СОТК (N₁) к числу ядер в нормальной слизистой (N) на единицу площади базальной мембраны.

Электронно-микроскопическое исследование проводили на материале, фиксированном в 2,5 % глутаральдегиде, с последующей дофиксацией 4 % осмием. Материал заливали в смесь эпонов. Срезы (25-300 А), полученные на ультратоме LKB-7A (LKB, Malmo, Sweden), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца, после чего изучали и фотографировали в электронном микроскопе JEM-100S (Токуо, Япон).

Морфометрический анализ осуществлялся с помощью системы компьютерного анализа микроскопических изображений IMSTAR (Imstar S.A. Paris, France). Морфологическое изображение, поступающее через оптическую систему микроскопа Jenamed-2 (Zeiss, Jena Germany) при уве-

увеличении 320 (объектив 40, окуляр 10, фильтр 0,8) регистрировались черно-белой видеокамерой (Canon, Токуо, Япон, разрешение 740x573 pci), вмонтированной в тубус микроскопа, и передавалось через отдельный монитор в компьютер Pentium-90 (Texas Instruments, Dallas, USA). Математическая обработка результатов исследования проводилась с помощью программы "EXCEL" для WINDOWS на персональном компьютере "Pentium".

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клиника НЯК у обследованного контингента больных характеризовалась классической картиной, включающей боль в животе, нарушение стула (у подавляющего большинства понос) с примесью крови. Следует подчеркнуть, что нарушение стула в виде запора встречалось только у лиц с легким течением НЯК. Внекишечные проявления заболевания верифицировались у лиц со средним и тяжелым течением язвенного колита. Большинство из них ассоциировалось с обострением процесса в толстой кишке.

У 100 % обследованных больных с НЯК констатировалось поражение СОТК. Объем поражения коррелировал с тяжестью клинической симптоматики. При колоноскопии выявлялись классические признаки заболевания: гиперемия, отек, размытость или исчезновение сосудистого рисунка, кровоизлияния, эрозивно-язвенное поражение слизистой оболочки кишки, контактная, а в тяжелых случаях спонтанная кровоточивость. При среднем и тяжелом по тяжести процессах на стенках кишки определялись фибринозные или гнойные налеты.

При морфологическом исследовании для всех степеней тяжести характерным было наличие инфильтративных изменений, локализующихся в пределах слизистой оболочки, различной плотности. Основу инфильтрата чаще всего представляли лимфоциты, что служило важным диагностическим признаком хронического воспаления. Типичным было обнаружение крипт-абсцессов, клеток Панета, атрофии слизистой или дистрофических изменений колоноцитов. Нередко определялось кистозное перерождение желез, кровоизлияния в СОТК.

Данные проведенных исследований свидетельствуют о том, что в норме эпителиоциты слизистой оболочки кишечника проявляют высокий потенциал пролиферативной активности, выраженный через I_{PCNA} (I_{PCNA}=63,8±4,6 %). При СПК 1-го типа он достоверно не изменяется (59,6±4,9 %), а при СПК 2-го типа – происходит значительное снижение I_{PCNA} до 48,6±3,9 %. I_{PCNA} при НЯК значительно снижается по сравнению с таковым при СПК 2-го типа. Важным представляется факт прогрессирующего снижения I_{PCNA} по мере нарастания тяжести клинической симптоматики НЯК.

Таким образом, полученные результаты исследования доказали, что I_{PCNA} может служить важным диагностическим критерием не только в установлении различных типов СРК, но и степеней тяжести НЯК.

Параллельно с I_{PCNA} изменяется уровень $I_{CYCL-D1}$. $I_{CYCL-D1}$ в норме равен $28,3 \pm 3,3$ %. У больных СРК 1-го типа он повышается до $37,5 \pm 4,5$ %, что отражает компенсацию процессов клеточного обновления. У больных СРК 2-го типа $I_{CYCL-D1}$ снижается ниже нормального уровня ($20,9 \pm 3,2$ %). При НЯК отмечается выраженное снижение содержания $I_{CYCL-D1}$ по сравнению с нормальным уровнем. Величина $I_{CYCL-D1}$ достоверно не различалась в зависимости от тяжести течения НЯК.

$I_{АПТ}$ колоноцитов у практически здоровых пациентов низок и составляет $1,8 \pm 0,5$ %. У больных СРК 1-го типа он увеличивается, хотя данное повышение носит недостоверный характер ($2,2 \pm 0,4$ %, $p > 0,05$). У больных СРК 2 типа отмечается значительное повышение $I_{АПТ}$ (до $3,6 \pm 0,5$ %), сопоставимое с легким течением язвенного колита. При средней тяжести и тяжелых формах НЯК $I_{АПТ}$ возрастает еще в большей степени, достоверно различаясь с аналогичным показателем у лиц с легким течением заболевания.

Морфометрически при всех степенях тяжести НЯК констатировалось увеличение плотности распределения ядер колоноцитов на единицу площади базальной мембраны. По мере утяжеления воспалительного процесса коэффициент плотности ядер достоверно повышался. При легких степенях тяжести НЯК он поднимался до $1,4 \pm 0,2$, а при выраженном воспалительном процессе – до $1,9 \pm 0,3$. Повышение плотности распределения ядер колоноцитов СОТК объясняется усилением пролиферации эпителиоцитов толстой кишки, что является отражением компенсаторных процессов и общебиологической реакции на воздействие повреждающего фактора.

Наращение апоптоза колоноцитов при НЯК объясняется снижением выработки PCNA и циклина D_1 по сравнению с группой практически здоровых и больных СРК 1 типа. При этом обнаружена сильная корреляционная связь между прогрессирующим уменьшением I_{PCNA} при утяжелении воспалительного процесса при НЯК и усилением апоптоза ($r = 0,75$). Таким образом, усиление апоптоза при НЯК связано с прогрессирующим снижением выработки PCNA колоноцитами.

По степени уменьшения I_{PCNA} , с одной стороны, и выраженности апоптоза, с другой, можно судить о тяжести воспалительного процесса в толстой кишке. Диагностически и прогностически значимой представляется величина отношения $I_{АПТ}$ к I_{PCNA} . Значение дроби менее 0,04 соответствует нормальному клеточному гомеостазу в СОТК. У больных СРК 2-го типа эта величина более 0,04, но менее 0,08, у больных с легким течением НЯК от 0,08 до 0,18, при течении НЯК средней степени тяжести от 0,18 до 0,25, а при тяжелом течении заболевания более 0,25.

Таким образом, используя показатели пролиферативной активности и апоптозной гибели эпителиоцитов, возможно прогнозировать течение репаративных процессов в стенке кишечника и их исходы, оценивать опасность малигнизации клеток. Полученные данные могут быть применены в дифференциации СРК 2-го типа и малосимптомного течения НЯК, что позволит оптимизировать тактику ведения больных с колоректальной патологией. В дифференциации малосимптомного по течению НЯК от 2-го типа СРК особое значение имеет величина I_{PCNA} . Значительное снижение данного показателя при НЯК говорит о его высокой чувствительности и специфичности в диагностике эрозивно-язвенных поражений толстой кишки.

По-видимому, механизмы апоптоза и некроза являются ведущими в формировании эрозивно-язвенных дефектов слизистой оболочки кишечника и могут преобладать на разных стадиях течения заболевания, что подтверждается нарастанием процессов апоптоза по мере утяжеления течения НЯК с последующим доминированием некровоспалительных изменений колоноцитов. В связи с этим заслуживают внимание данные ряда авторов о том, что все факторы, инициирующие апоптоз, при увеличении своей интенсивности вызывают некроз [4].

Различный по тяжести воспалительный процесс при НЯК сопровождался существенным отклонением функциональной активности апудоцитов и тучных клеток от нормальных величин.

При НЯК возрастало общее количество эндокринных клеток в реакции на хромогранин А, что значительно превышало соответствующие показатели в группе здоровых и больных с СРК 1-го типа. Количество и функциональная активность апудоцитов, продуцирующих серотонин и мелатонин, при НЯК были повышены по сравнению с контролем и группой больных с СРК 1-го типа. При электронной микроскопии выявлены гиперплазия секреторных гранул и активация эндоплазматической сети ЕС-клеток. Содержание и функциональная активность тучных клеток и апудоцитов, продуцирующих ВИП, при язвенном колите значительно снижались.

Обнаружена обратная зависимость между степенью увеличения количества клеток, продуцирующих мелатонин (ЕС₂-клеток), и тяжестью течения НЯК. По всей видимости, мелатонин обладает протективным эффектом, защищая СОТК от факторов альтерации. Возможно, он непосредственно стимулирует клеточную пролиферацию, а увеличение количества мелатонинпродуцирующих клеток в СОТК при НЯК имеет компенсаторное значение. Относительное снижение их числа при утяжелении воспалительного процесса говорит об истощении компенсаторных возможностей организма. Усиленной выработкой мелатонина объясняется поверхностный характер воспалительного процесса в СОТК при НЯК и относительно низкий процент перфораций киш-

ки при данном заболевании. Наши данные по роли мелатонина в организме согласуются с большинством проведенных исследований в мире [5, 7]. Гипоплазия эндокринных клеток, секретирующих мелатонин, при язвенной болезни желудка с частыми обострениями и осложнениями подтверждает данную точку зрения [Осадчук М.А., Кулиджанов А.Ю., 2002].

Достоверных отличий между общим числом апудоцитов, тучных и D₁-клеток при различных степенях тяжести течения НЯК не выявлено.

Обнаруженные в ходе исследования изменения количества, функциональной активности апудоцитов и тучных клеток сигмовидной кишки у больных с НЯК позволяют объяснить типичные для этой патологии клинические проявления с позиции биологических эффектов биогенных аминов и пептидных гормонов.

Известно, что мелатонин обладает выраженными антиоксидантными свойствами. В клинике и эксперименте продемонстрированы выраженные протективные эффекты мелатонина [Комаров Ф.И. с соавт., 2000]. Установлено, что мелатонин оказывает прямое регулирующее действие на перистальтику кишечника, стимулируя (высокие дозы) или ингибируя (низкие дозы) гладкую мускулатуру желудочно-кишечного тракта [3]. В связи с этим можно предположить, что высокая концентрация мелатонина в кишечнике обеспечивает развитие диареи.

Повышение продукции серотонина апудоцитами СОТК является патологическим процессом и приводит к дискинезии кишечника и тенезмам. Гиперпродукция серотонина усиливает свертываемость крови, приводит к спазму микроскопических сосудов и отеку стенки кишки, что неизбежно сопровождается ишемией СОТК, ее некрозом с образованием эрозий, язв и кровотечения. Известно, что серотонин – один из раздражителей ноцирепторов, в связи с чем его гиперпродукция обуславливает, по-видимому, и наличие болевого синдрома при НЯК.

Больные НЯК были обследованы и в стадию клинко-эндоскопической ремиссии заболевания. При этом выявлено, что в неактивную фазу НЯК количество энтерохромаффинных, мелатонин- и серотонинпродуцирующих клеток снижается, однако их численность существенно превышает нормальную. Популяция мастоцитов и ВИП-продуцирующих клеток остается сниженной. Данные нарушения находят объяснение в резидуальных функциональных и структурных изменениях толстой кишки при НЯК. Так, повышенное количество и функциональная активность мелатонинпродуцирующих клеток является компенсаторной реакцией на усиленный апоптоз. С другой стороны, после тяжелого обострения НЯК образуются многочисленные участки замещения полноценной СОТК соединительной тканью, вследствие рубцевания язвенных дефектов. Поэтому в СОТК

происходит компенсаторная гиперплазия и увеличение количества мелатонинпродуцирующих клеток. Повышенное содержание серотонинпродуцирующих клеток объясняет хронические боли у больных НЯК, сохраняющейся колонодискинезии в ремиссию заболевания, возможные нарушения микроциркуляции в кишке. Снижение численности мастоцитов в неактивной фазе заболевания оказывает отрицательное влияние на циркуляцию крови в стенке кишки, вследствие микротромбообразования на фоне снижения продукции гепарина этими клетками. Хроническая ишемия слизистой является мощным инициатором апоптоза колоноцитов и фиброгенеза.

Полученные результаты следует использовать при построении алгоритма диагностического поиска и рациональной терапевтической тактики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Снижение пролиферативных показателей (PCNA и циклина D₁) при НЯК инициирует усиление апоптоза колоноцитов, вследствие их неполноценной регенерации.

2. В патогенезе эрозивно-язвенных дефектов при НЯК участвуют как процесс апоптоза, так и – некроза. Последний является, по-видимому, следствием избыточного воздействия ряда факторов, вызывающих апоптоз.

3. В фазе клинко-эндоскопической ремиссии НЯК индексы апоптоза и маркеров пролиферации (PCNA и циклина D₁) существенно отклоняются от аналогичных показателей здоровых и больных СРК 1-го типа, что поддерживает нарушение клеточного гомеостаза, сохранение и прогрессирование морфологических изменений СОТК, которые являются фоном для рецидива заболевания и развития неоплазий.

4. Определение в слизистой оболочке I_{PCNA} и мелатонинпродуцирующих клеток в СОТК имеет важное значение в диагностике и прогнозировании тяжести течения НЯК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адлер Г. Болезнь Крона и язвенный колит / Пер. с нем. А.А. Шептулин. – М.: ГЭОТАР. – Медицина, 2001. – 500 с.
2. Ивашкин В.Т., Лапина Т.Л., Бондаренко О.Ю., // Росс. журн. гастроэнтеролог., гепатолог., колопроктолог. – 2002. – № 6. – С. 38–43.
3. Райхлин Н. Т., Кветной И. М., Южаков В. В. и др. // APUD – система: общепатологические проблемы и онкологические аспекты. – Ч. 1. – Обнинск. – 1993. – С. 7–25.
4. Burchill S.A., Westwood G. // Apoptosis. – 2002. – № 1. – 5–12.
5. Beyer C.E., Steketee J.D., Saphier D. // Biochem. Pharmacol. – 1998. – Vol. 56(10). – P. 1256–1272.
6. Susin S.A., Zamzami N., Castedo M. et al. // J. exp. Med. – 1997. – Vol. 186. – P. 25–37.
7. Sasaki M., Jordan P., Jon., et al. // BMC Gastroenterol. – 2002. – Vol. 2(1). – P. 9.