

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ПАРАЛЛЕЛИ ПРИ ГАСТРОДУОДЕНАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ У ПОДРОСТКОВ

Л.А. Страшок, И.В. Сорокина, Г.Б. Павлова

Харьковская медицинская академия последипломного образования
Харьковский государственный медицинский университет

Ключевые слова: дуоденальная язва, хронический гастродуоденит, слизистая оболочка желудка, слизистая оболочка двенадцатиперстной кишки, иммуногистохимическое исследование, цитокины, подростки.

Большинство исследователей считают, что хронический гастродуоденит (ХГД) и дуоденальная язва (ДЯ) начинаются в подростковом возрасте. Экзогенные факторы, определяющие возникновение и формирование ХГД и ДЯ, практически идентичны. Что касается эндогенных причин формирования у больного ХГД либо ДЯ, то эти механизмы являются предметом пристального изучения.

Имеются неоднозначные и противоречивые результаты исследований, посвященных роли иммунных реакций в механизмах воспалительных и язвенных повреждений желудочно-кишечной области, особенно в половом и возрастном аспектах. Иммуногенез воспаления и язвы рассматривают как связующее звено между патологическими процессами, участвующими в формировании гастрита и язвы: гипоксией, микроциркуляторными нарушениями, дистрофией (атрофией) слизистой оболочки желудка (СОЖ) и двенадцатиперстной кишки (СОДК), снижением процессов регенерации и апоптозом [1, 6].

В центре внимания клинической иммунологии находятся гуморальные факторы взаимодействия клеток и элементов внутренней среды организма — цитокины. К многочисленной группе пептидов, обладающих иммунотропным действием, относятся: интерлейкины (ИЛ), колониестимулирующие факторы, интерфероны, факторы некроза опухоли (ФНО- α , β). Для функционирования цитокиновой системы необходим сбалансированный синтез основных групп цитокинов — стимуляторов и супрессоров, который обеспечивает благоприятную для организма выраженность цитокинрегулируемых реакций. Именно разбалансированность цитокиновой регуляции и нарушение равновесия альтернативных по биологической активности пулов молекул ведут к патологии.

В клинической медицине роль цитокинов преимущественно рассматривается применительно к проблемам иммуномодуляции, воспаления, апоптоза, за-

живления ран, ангиогенеза, нейроиммуноэндокринных взаимодействий, бактериальных и паразитарных инфекций, злокачественных новообразований, регуляции гемопоеза [2]. Таким образом, представляет интерес изучение цитокинового статуса при хроническом гастродуодените и дуоденальной язве.

Цель исследования — изучение содержания ИЛ-1, ИЛ-4 и ФНО- α у подростков с ХГД и ДЯ в сыворотке крови и слизистой оболочке желудка и двенадцатиперстной кишки.

Материалы и методы исследования

Обследовано 50 юношей и 38 девушек в возрасте 15—18 лет с ДЯ и ХГД. Иммуногистохимическое исследование проведено у 12 больных с ХГД и 18 с ДЯ. Распределение больных по полу и нозологическим формам представлено в табл. 1.

Диагноз верифицирован на основании клинико-anamnestического, эндоскопического, морфологического и иммуногистохимического методов исследования. Уровень ИЛ-1, ИЛ-4 и ФНО- α в сыворотке крови определяли при помощи стандартных наборов для иммуноферментного анализа («Протеиновый контур», Россия). Иммуногистохимическое исследование проводили на парафиновых срезах толщиной 5—6 мкм непрямым методом Кунса по методике Brosnan. Иммунные клетки дифференцировали с помощью моноклональных антител (МКА) к различным типам клеток фирмы Chemicon (USA). Использовали МКА против ИЛ-1, ИЛ-4 и ФНО- α . Апоптоз определяли с МКА CD95 (Novocastra Laboratories Ltd.). В качестве люминесцентной метки использовали F (ab)-2 — фрагменты кроличьих антител против иммуноглобулинов мыши, меченных ФИТЦ. Препараты изучали в люминесцентном микроскопе МЛ-2 с использованием светофильтров ФС-1-2, СЗС-24, БС-8-2, УФС-6-3.

Группу сравнения составили 28 здоровых подростков (16 девушек и 12 юношей).

Таблица 1. Распределение больных по полу и нозологическим формам

Заболевание	Девушки	Юноши	Всего
ХГД	24	27	51
ДЯ	14	23	37
Всего	38	50	88

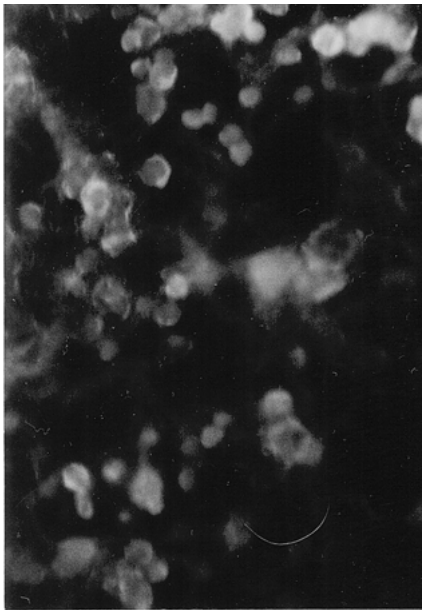


Рис. 1. Многочисленные клетки-продуценты ИЛ-1 в зоне воспалительной инфильтрации СОЖ при хроническом гастрите (непрямой метод Кунса с МКА к ИЛ-1; ув. 600)

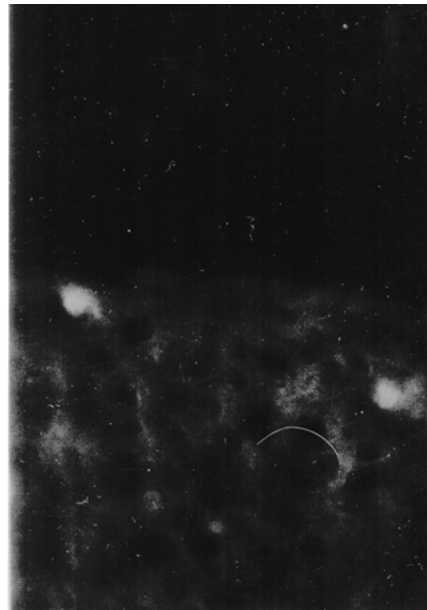


Рис. 2. Единичные апоптотические клетки в эпителии СОЖ при хроническом гастрите (непрямой метод Кунса с МКА CD95; ув. 400)

При хроническом гастродуодените у 9 больных (75%) морфологически выявлен поверхностный пангастрит, а у 3 (25%) — процесс ограничивался антральным отделом. Активный антрим-гастрит отмечался у 10 (83%) пациентов. Степень активности гастрита у 7 (58%) больных была легкой, а у 3 (25%) — умеренной. В воспалительном инфильтрате в эпителии и собственной пластинке СОЖ определяли лимфоциты, плазмациты, макрофаги, нейтрофильные гранулоциты и эозинофилы. Результаты изучения количества клеток-продуцентов цитокинов ИЛ-1, ИЛ-4, ФНО- α и индекс апоптоза эпителиоцитов СОЖ представлены в табл. 2. Наибольшую плотность в воспалительном инфильтрате имели клетки-продуценты ИЛ-1 (рис. 1). При хроническом гастрите у детей

подросткового возраста в СОЖ определялись единичные эпителиоциты в состоянии апоптоза (рис. 2). При окраске по Романовскому — Гимзе *Helicobacter pylori* (H. pylori) выявлен в 10 (83%) наблюдениях.

В СОЖ при ДЯ глубоких морфологических изменений не наблюдали. Антральный гастрит выявлен у всех больных, поражение фундального отдела — у 11 (61%). При гистологической оценке гастрита выявили признаки поверхностного поражения с умеренно выраженной активностью: инфильтрацию собственной пластинки макрофагами, лимфоцитами, плазматическими клетками, нейтрофильными гранулоцитами, клетками-продуцентами ИЛ-1, ИЛ-4, единичными клетками-продуцентами ФНО- α . Апоптотические эпителиоциты в СОЖ при ДЯ встречались несколько ча-

Таблица 2. Относительное количество клеток-продуцентов цитокинов в воспалительном инфильтрате слизистой оболочки желудка и индекс апоптоза эпителиоцитов, $\times 400$ в пересчете на 100 клеток

Группа больных	Цитокины			Индекс апоптоза
	ИЛ-1	ИЛ-4	ФНО- α	
ХГД (n = 12)	14,2 \pm 2,9	9,1 \pm 1,5	2,2 \pm 0,9	2,5 \pm 0,4
ДЯ (n = 18)	17,5 \pm 2,8	12,5 \pm 3,0	1,8 \pm 0,7	2,90 \pm 0,9

Таблица 3. Относительное количество клеток-продуцентов цитокинов в воспалительном инфильтрате СОДК и индекс апоптоза энтероцитов, $\times 400$ в пересчете на 100 клеток

Группа больных	Цитокины			Индекс апоптоза
	ИЛ-1	ИЛ-4	ФНО- α	
ХГД (n = 12)	16,2 \pm 2,0	13,2 \pm 2,5	1,5 \pm 0,9	2,5 \pm 0,6
ДЯ (n = 18)	18,6 \pm 3,5	16,6 \pm 3,5	1,7 \pm 0,8	3,2 \pm 0,9

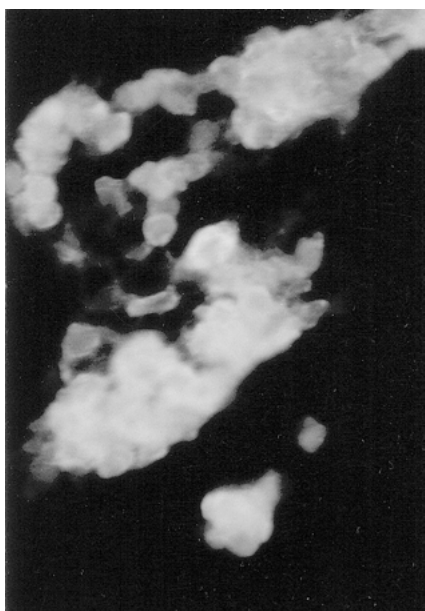


Рис. 3. Скопление апоптозноизмененных десквамированных эпителиоцитов СОЖ при ДЯ (непрямой метод Кунса с МКА CD95; ув. 1100)



Рис. 4 Клетки-продуценты ИЛ-4 в зоне воспалительной инфильтрации СОДК при хроническом дуодените (непрямой метод Кунса с МКА к ИЛ-1; ув. 400)

ще (рис. 3), чем при ХГД (см. табл. 2). Н. pylori обнаруживали в СОЖ 11 (61%) пациентов.

При оценке морфологического состояния СОДК при ХГД выявили у всех больных хронический поверхностный дуоденит легкой степени. Среди элементов воспалительного инфильтрата выявляли клетки-продуценты ИЛ-1, ИЛ-4, значительно реже — ФНО- α (табл. 3). В СОДК клетки-продуценты ИЛ-4 встречались чаще, чем в СОЖ (рис. 4). Апоптозный индекс эпителия составил $2,5 \pm 0,6$. При окраске по Романовскому — Гимзе Н. pylori визуализированы лишь в 1 наблюдении.

Во время гистологического исследования СОДК при ДЯ в периульцерозной зоне выявили активный хронический поверхностный дуоденит, который в 16 (82%) случаях носил умеренный характер, а в 2 (18%) наблюдениях был диагностирован как выраженный дуоденит. При этом у всех больных, в отличие от ХГД, определялись очаги желудочной метаплазии покровного эпителия. Среди клеток воспалительного инфильтрата выявляли клетки-продуценты цитокинов: чаще — ИЛ-1, ИЛ-4, реже — ФНО- α (см. табл. 3). Апоптозный индекс энтероцитов был несколько выше, чем в группе с ХГД. Н. pylori визуализировали у 6 (33%) больных, локализовались они в участках метаплазированного эпителия.

При исследовании сыворотки крови ИФА выявили у всех больных при обострении ХГД и ДЯ достоверное повышение уровней ИЛ-1 и ИЛ-4. Содержание ФНО- α у всех больных было достоверно снижено (табл. 4).

Повышение уровня ИЛ-1 является закономерным, так как именно его выделение моноцитами запускает каскад иммунных и воспалительных реакций. ИЛ-4 ингибирует выделение ИЛ-1 и ФНО- α , поэтому увеличение его содержания также можно объяснить. Повышение уровней ИЛ-1 и ИЛ-4 в сыворотке крови коррелирует ($r = +0,7$ и $r = +0,8$ соответственно; $P < 0,05$) с увеличением плотности инфильтрации их клеток-продуцентов. Динамическое равновесие между этими цитокинами, возможно, определяет оптимальный уровень протекания патофизиологических реакций, а смещение равновесия в ту или иную сторону может привести к гиперэргическим или к анэргическим реакциям.

Интересные результаты получены в отношении клеток-продуцентов ФНО- α . По сравнению с количеством клонов клеток-продуцентов ИЛ-1 и ИЛ-4 от-

Таблица 4. Уровень интерлейкинов 1, 4 и фактора некроза опухоли α в сыворотке крови подростков с ХГД и ДЯ, пкг/мл

Группа больных	ИЛ-1	ИЛ-4	ФНО- α ,
ХГД (n = 51)	$77,8 \pm 3,6^{* **}$	$79,2 \pm 4,78^{* **}$	$18,4 \pm 5,4^{**}$
ДЯ (n = 37)	$131,3 \pm 5,9^{* **}$	$137,5 \pm 4,8^{* **}$	$16,2 \pm 3,9^{**}$
Контроль (n = 28)	$58,0 \pm 1,8$	$32,0 \pm 3,5$	$31,0 \pm 2,1$

Примечание. * Достоверность разницы между группами ($P < 0,01$).

**Достоверность разницы по отношению к контролю ($P < 0,01$).

носительное содержание этих клеток невелико. Снижение концентрации ФНО- α в сыворотке крови при ДЯ и ХГД, выявленное нами у подростков, соответствовало невысокой плотности клеток-продуцентов ФНО- α в СОЖ и СОДК.

Некоторое противоречие возникает при сопоставлении данных в отношении количества клеток-продуцентов ИЛ-1 и ФНО- α . Известно, что эти цитокины являются медиаторами развития воспалительного процесса. Основные клетки-продуценты ИЛ-1 представлены активированными макрофагами, моноцитами, нейтрофилами, а ФНО- α вырабатываются CD8-лимфоцитами, реже — CD4-лимфоцитами. Среди CD4 лимфоцитов Th₁ продуцируют ФНО- α , тогда как Th₂ преимущественно продуцируют ИЛ-4. В наших исследованиях продукция ИЛ-4 повышена. С другой стороны, для подростков характерны особенности эндокринного гомеостаза [5, 7]. В литературе имеются единичные работы об эндокринной регуляции цитокиновой системы. В частности, есть данные о том, что кортизол способен блокировать рецепторы клеток-продуцентов ФНО- α , оставляя открытыми рецепторы к ИЛ-1. Кортикостероиды вовлечены в иммунопоз и иммуногенез на правах имманентных факторов, ингибирующих и инициирующих различные звенья иммуногенеза. То есть повышение уровня кортизола может подавлять выработку ФНО- α . На макрофагах найден рецептор к гипоталамическому кортикотропин-релизинг-фактору (CRF). На культуре тканей *in vitro* показано, что CRF инициирует биосинтез ИЛ-1 в макрофагах. Сведений о подобном действии в отношении ФНО- α в доступной литературе нет [8]. Не исключена возможность, что и это звено принимает участие в нейроиммуноэндокринной регуляции воспалительно-деструктивных процессов. В исследованиях гормонального статуса у подростков, страдающих ДЯ и ХГД, выявлено значительное повышение уровней кортизола и половых стероидов [4]. Возможно, этим объясняются низкий уровень ФНО- α в сыворотке крови и небольшая плотность клеток-продуцентов ФНО- α в воспалительном инфильтрате СОЖ и СОДК при ХГД и ДЯ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аруин Л.И., Капуллер Л.Л., Исаков В.А. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника.— М: Трида-Х, 1998.— 483 с.
2. Игнатъева Г.А. Иммунная система и патология // Патол. физиол. и экспер. терап.— 1998.— № 1.— С. 35— 41.
3. Страшок Л.А., Пархоменко Л.К. Ферменты первой линии антиоксидантной защиты у детей подросткового возраста с хроническим гастродуоденитом // Современная педиатрия.— 2004.— № 4, т. 5.— С. 126— 129.
4. Страшок Л.А. Гормональный статус у детей подросткового возраста, больных хроническим гастродуоденитом и дуоденальной язвой.— К., 2005.— Вып. 14.— С. 348— 351.

При ДЯ по сравнению с ХГД отмечена тенденция к усилению апоптоза в эпителии желудка и двенадцатиперстной кишки. Явления апоптоза инициируются многими факторами: γ -излучением, свободными радикалами, ионами Ca, Mg, Mn, азота оксидом вирусами и бактериями, в частности H. pylori, ФНО- α , каспазами, цитостатиками, кортикостероидами, диоксином. Среди ингибиторов апоптоза наибольшее внимание уделяют ИЛ-9, ростовым факторам, антиоксидантным ферментам, половым стероидам, ионам Zn. Невысокий уровень апоптоза, по-видимому, можно объяснить адекватностью антиоксидантной защиты (мы наблюдали повышение содержания глутатионпероксидазы и супероксиддисмутазы у больных с гастродуоденальной патологией) в ответ на оксидативный стресс, гиперандрогенией у подростков с ДЯ. Возможно, это также обусловлено превалированием анаболических процессов в молодом возрасте и генетически детерминированным невысоким уровнем апоптоза в детском и юношеском возрасте.

Выводы

1. ДЯ и ХГ у подростков протекают на фоне выраженного дисбаланса в системе цитокинов, который является отражением нарушений в регуляции механизмов иммунного ответа и неспецифических защитных реакций.
2. В воспалительном инфильтрате СОЖ и СОДК при ДЯ и ХГД у подростков при иммуногистохимическом исследовании определяются высокая плотность клонов клеток-продуцентов ИЛ-1 и ИЛ-4 и незначительная — клеток-продуцентов ФНО- α .
3. В сыворотке крови определяются достоверное повышение содержания ИЛ-1, ИЛ-4 и снижение уровня ФНО- α , более значимое при ДЯ, чем при ХГД.
4. Выявлена высокой степени положительная корреляция между уровнем цитокинов в сыворотке крови и количеством клеток-продуцентов этих цитокинов в воспалительном инфильтрате больных с ДЯ и ХГД.
5. Исследование явлений апоптоза в СОЖ и СОДК выявило тенденцию к его активации при ДЯ.

5. Di Leo V., Yang P.C., Berin M.C., Perdue M.H. Factors Regulating the Effect of IL-4 on Intestinal Epithelial Barrier Function. // *Int. Arch. Allergy, Immunol.*— 2002.— 29 (3).— P. 219— 227.
6. Dixon M., Genta R., Yardley J. Classification and grading of gastritis // *Am. J. Surg. Pathol.*— 1996.— Vol. 20.— P. 1161— 1181.
7. Majori M., Caminati A., Nokamura Y. et al. T-cell cytokine pattern at three time points during specific immunotherapy for mitesensitive asthma // *Clin. Exp. Allergy.*— 2000.— Vol. 30, N 3.— P. 341— 347.
8. Tommeras K., Cabero J.L., Mardh S. Expression of extracellular matrix proteins in the fetal rat gastric mucosa // *Anat. Embryol. (Berl.)*— 2000.— 201 (3).— P. 149.

ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ПАРАЛЕЛІ У ПІДЛІТКІВ З ГАСТРОДУОДЕНАЛЬНОЮ ПАТОЛОГІЄЮ

Л.А. Страшок, І.В. Сорокіна, Г.Б. Павлова

Виразкова хвороба дванадцятипалої кишки та хронічний гастродуоденіт у підлітків перебігають з виразним дисбалансом у системі цитокінів. У запальному інфільтраті в слизовій оболонці шлунка та дванадцятипалої кишки при дуоденальній виразці та хронічному гастродуоденіті виявляють високу щільність клонів клітин-продуцентів ІЛ-1 та ІЛ-4 і незначну кількість клітин-продуцентів ФНП- α . Це корелює з їхнім умістом у сироватці крові. Дослідження апоптозу в слизовій оболонці шлунка та дванадцятипалої кишки виявило його активацію при виразковій хворобі дванадцятипалої кишки.

IMMUNE AND HISTOCHEMICAL PARALLELS OF THE JUVENILES WITH GASTRODUODENAL PATHOLOGY

L.A. Strashok, I.V. Sorokina, G.B. Pavlova

Duodenal ulcer and chronic gastroduodenitis in patients of juvenile age are accompanied with the marked imbalance in the cytokine system. In the inflammatory infiltrate of gastric and duodenal mucosa at duodenal ulcer and chronic gastroduodenitis, a high density of cell-producers clones of IL-1 and IL-4 can be revealed and low concentration of TNF-alfa cell-producers. This correlates with their blood serum levels. The investigation of apoptosis phenomena in gastric and duodenal mucosa showed its activation in the case of duodenal ulcer.