



Е.Ф. Барінов, О.М. Сулаєва

Донецький національний медичний університет імені Максима Горького

Кінетика покривного епітелію дванадцятипалої кишки в умовах гострої виразкової кровотечі

Ключові слова

Дванадцятипала кишка, виразкові кровотечі, проліферація, апоптоз.

Наслідки кровотечі з виразкових дефектів дванадцятипалої кишки (ДПК) залежать не тільки від ефективності гемостазу, виразності гострої фази відповіді на ушкодження, ступеня крововтрати тощо, а й від швидкості та ефективності епітелізації ранової поверхні [6]. Причому розвиток кровотечі, як і сам процес формування виразкового дефекту, пов'язують із порушенням цілісності епітеліального шару, зміною процесів проліферації й диференціювання клітин, що визначає особливості кінетики покривного епітелію і зниження його бар'єрних властивостей [2]. Цей параметр в умовах гострої кровотечі відіграє вирішальну роль, оскільки детермінує ймовірність і швидкість епітелізації поверхні виразкового дефекту, обмежуючи таким чином дію травмівних чинників — кислот, жовчі, ферментів, мікроорганізмів [4]. У зв'язку із цим виникає низка невирішених питань. Наприклад, не зрозуміло, як змінюється швидкість проліферації клітин в умовах виразкової кровотечі, наскільки при цьому виразні вияви апоптозу та у яких компартментах слизової оболонки (СО) вони превалюють, чи носять ці зміни специфічний для виразкової хвороби (ВХ) характер або універсальні за будь-якої гострої патології травного каналу? З'ясування цих питань і визначило мету роботи.

Матеріали та методи дослідження

Проведено морфологічний аналіз біоптатів крайової зони виразок дванадцятипалої кишки (ДПК) 46 пацієнтів віком ($54 \pm 8,6$) року з гострими кровотечами. Тривалість хвороби становила ($6,3 \pm 3,1$) року. Всім хворим було проведе-

но діагностичну езофаго-гастродуоденофіброскопію за загальноприйнятою методикою з використанням апарата GIF Q 40 «Olympus». Під час ендоскопії за допомогою стандартних біопсійних щипців брали біоптати слизової оболонки із крайової зони виразки. Забір й оцінку біоптатів здійснювали до виконання ендоскопічного гемостазу, через 6–12 год, 1, 3 й 7 днів після ін'єкції розчину адреналіну. Біопсійний матеріал фіксували в 10 % розчині нейтрального формаліну, зневоднювали в спирті, заливали в парафін. Зрізи завтовшки 5 мкм забарвлювали гематоксиліном і еозином, проводили імуноцитохімічне дослідження. З цією метою три зрізи розміщували на вкритому адгезивом склі Super Frost Plus (Menzel, Німеччина). Для «демаскування» антигенів регідратовані зрізи обробляли в розчині Target Retrieval Solution (DAKO, Данія) з використанням мікрохвильової печі Samsung CE118KFR. Після блокування ендогенної пероксидазної активності пероксидазним блоком (DAKO) та неспецифічного зв'язування білків протеїновим блоком (DAKO) наносили первинні антитіла. Для аналізу проліферації та апоптозу клітин використовували моноклональні антитіла до Ki-67 та p53 відповідно (DAKO). Візуалізацію первинних антитіл проводили за допомогою полімерної системи детекції DAKO EnVision+. Препарати дофарбовували гематоксиліном Майєра [5]. В основну групу ввійшли пацієнти з позитивною динамікою й загоєнням виразкового дефекту. Контрольну групу (порівняння) склали пацієнти з гострою невиразковою патологією —

гострими панкреатитами, яким проводили діагностичну ФГДС.

Під час аналізу епітелію слизової оболонки оцінювали його наявність і товщину на ворсинках, у перехідній зоні й у ділянці крипт, щільність епітеліоцитів на одиницю довжини БМ, питому вагу келихоподібних клітин, відсоток клітин з ознаками вакуолізації та деструкції, питому щільність Ki-67⁺- і p53⁺-клітин у кожній зоні (на 100 клітин) [1]. Результати обробляли статистично з використанням пакета прикладних комп'ютерних програм [3].

Результати та їхнє обговорення

Крайова зона виразок ДПК на момент гострої кровотечі характеризувалася порушеннями рельєфу. Найчастіше реєстрували зниження висоти ворсинок і глибини крипт. У деяких ділянках спостерігалися руйнування ворсинок і деструкція покривного епітелію. У низці біоптатів виявляли короткі розгалужені ворсинки. У збереженому епітелії перехідної зони й криптах був високий вміст келихоподібних клітин. Цікаво, що зменшення висоти ворсинок і велика кількість келихоподібних клітин спостерігалися й у групі порівняння. Однак глибина крипт у контролі була на 47,8 % більша, ніж у пацієнтів з ВХ, що може свідчити про початок атрофічних змін у крайовій зоні слизової оболонки ДПК у хворих з виразковими кровотечами.

Розподіл процесів проліферації й апоптозу клітин покривного епітелію мав групоспецифічний характер. Так, у пацієнтів з гострою виразковою кровотечею Ki-67⁺-клітини виявляли у великій кількості в ділянці крипт (53,4 % ± 7,8 %), у перехідній зоні (31,9 % ± 5,4 %) і навіть на бічній поверхні ворсинок (16,8 % ± 4,3 %), що свідчить про сумарне посилення процесів проліферації й міграції клітин. Виняток становили лише окремі крипти, де був високий відсоток келихоподібних клітин — тут виявляли лише поодинокі Ki-67-позитивні клітини. На відміну від цього у групі порівняння процеси проліферації домінували в ділянці дна крипт, знижуючись у напрямку до основи ворсинок, і не реєструвалися на поверхні останніх.

Попри посилення проліферації, кількість функціональних епітеліоцитів у СО ДПК пацієнтів основної групи було обмеженим. Це було пов'язано з десквамацією епітеліального шару на 25,7 % поверхні СО. На ворсинках зареєстровано збільшення висоти клітин за рахунок набряку та вакуолізації, із частою дислокацією ядер. У окремих криптах виявлено відрив епітеліального шару від базальної мембрани. Імуноцитохімічне дослідження підтвердило виразне пору-

шення тканинного та клітинного гомеостазу. Експресія проапоптогену p53 мала генералізований характер на поверхні ворсинок і подекуди поширювалася на крипти, а імунопозитивний матеріал локалізувався не тільки в ядрах, а й в цитоплазмі клітин. Ці зміни багато в чому були пов'язані із глибиною порушення мікроциркуляції у власній пластинці СО. Вазодилатація супроводжувалася порушенням проникності судин й апоптозом ендотеліоцитів, наслідком чого був розвиток набряку, нейтрофільної інфільтрації, мікрокрововиливів. На відміну від цього у групі порівняння на тлі гострого панкреатиту також виявляли інтенсивне мічення на p53, що однак мало локальний характер — переважно у верхній половині ворсинок, тоді як біля їхньої основи та в ділянці крипт p53⁺-клітини не виявляли. Особливості локалізації p53⁺-клітин, власне, означають різний механізм активації експресії проапоптогену p53. У групі порівняння переважне розташування маркерів на верхівці й бічних поверхнях ворсинок асоціюється зі зрілими ентероцитами й клітинами, що закінчують життєвий цикл і чутливі до альтернативних чинників — активних радикалів кисню, цитокінів, ферментів. У принципі це означає прискорення кінетики епітеліоцитів за збереження просторового розподілу таких морфогенетичних процесів, як проліферація і диференціація. На відміну від цього за умов виразкової кровотечі експресія p53 має масований характер, що значно перевищує такий у групі порівняння, і має низку специфічних ознак. По-перше, привертає увагу локалізація p53 як у ядрі, так й у цитоплазмі епітеліоцитів, що припускає тривалу (понад 24 год) активацію апоптозу, яка може ініціювати розвиток кровотечі. По-друге, просторовий розподіл p53 у СО ДПК припускає загибель клітин різного ступеня зрілості (від старих на поверхні ворсинок до недиференційованих у криптах). Цей факт разом із зсувом кількості p53⁺- і Ki67⁺-клітин у бік апоптозу припускає формування дефіциту клітин покривного епітелію, принаймні на найближчі 1–2 доби. У трактуванні цих даних важливо враховувати, що експресія p53 на ранніх етапах відображає не стільки посилення запрограмованої клітинної загибелі, скільки активацію екстрених програм ядра на ушкодження і для клітин різної локалізації має різний наслідок [6]. Так, за нормальних умов активація p53 у криптах означає вихід із клітинного циклу, під час диференціювання на бокових поверхнях ворсинок — відновлення транспортних структур й оптимізацію енергетичного забезпечення клітин, на верхівці ворсинок — елімінацію старих клітин, що завершили клітинний цикл. Однак у

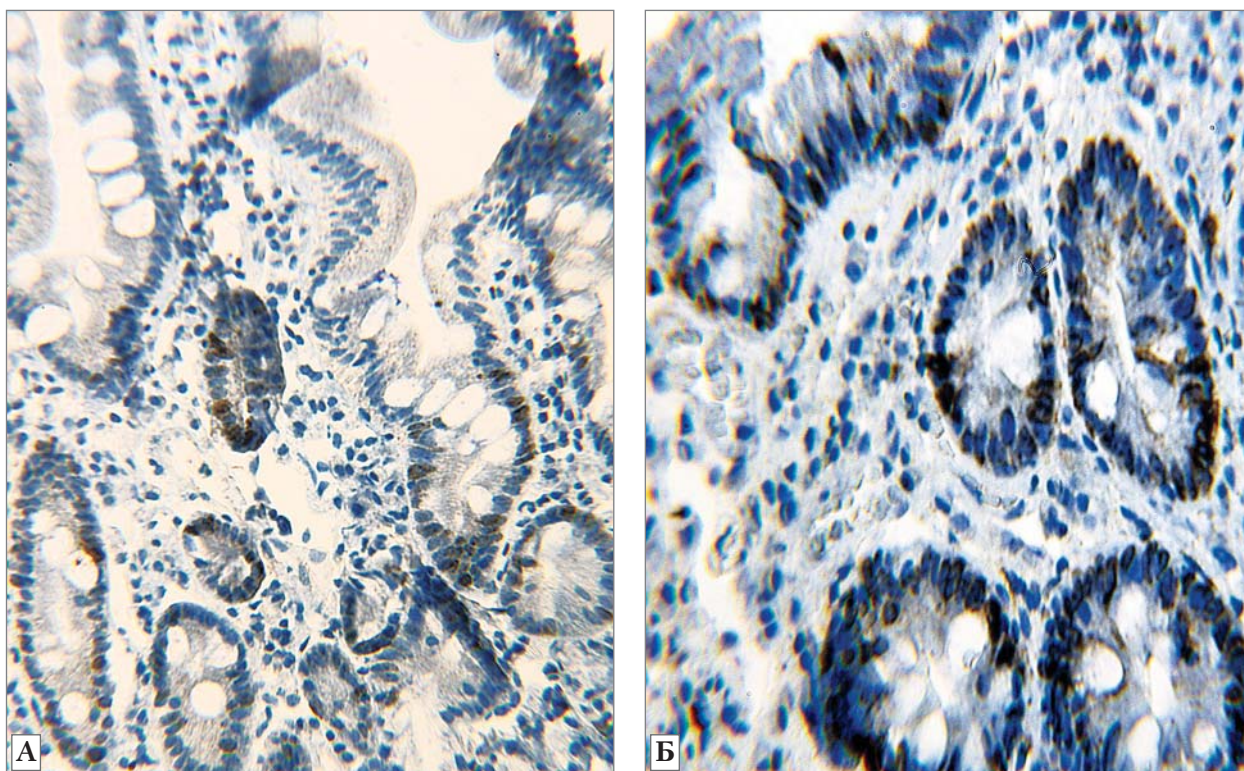


Рис. 1. Проліферація клітин покривного епітелію дванадцятипалої кишки в контрольній (А) та основній (Б) групі. Зростання частоти поділу в криптах та проліферація клітин біля основи ворсинок у хворих з виразковими кровотечами

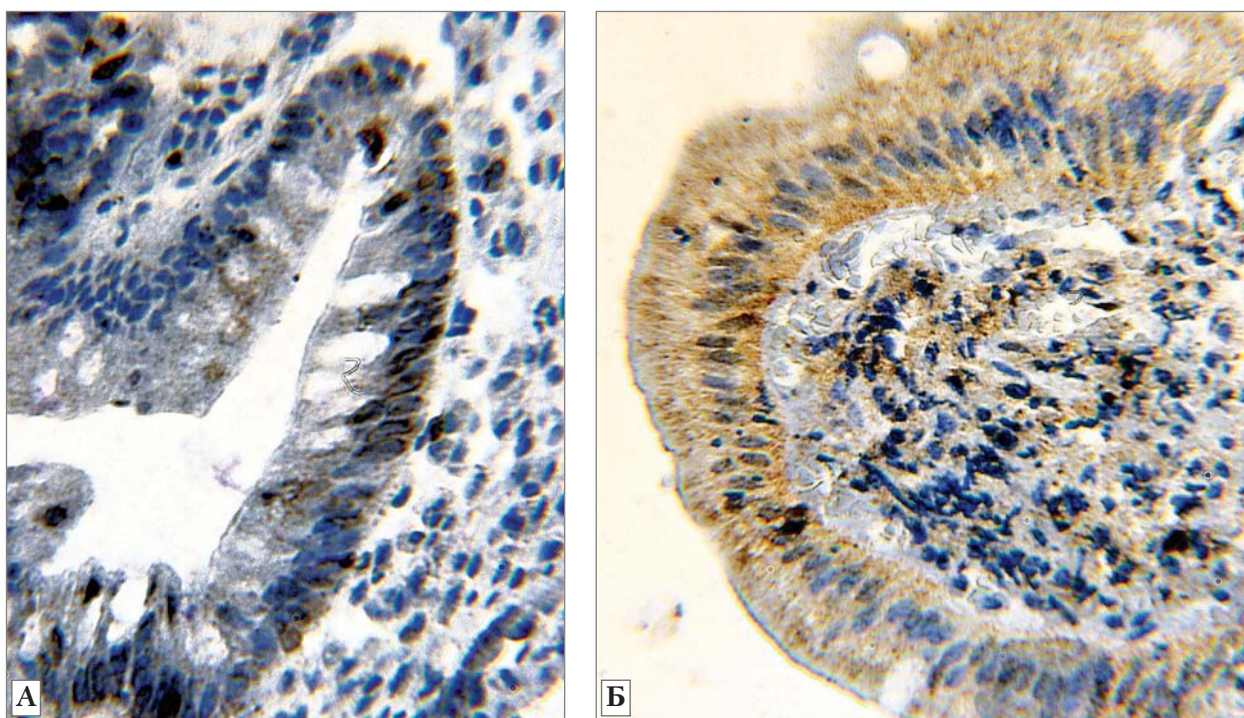


Рис. 2. Апоптоз ентероцитів дванадцятипалої кишки у хворих з виразковими кровотечами на момент госпіталізації (А) та через 12 год після ендоскопічного гемостазу (Б)

пацієнтів з основної групи порушена просторова організація диферону ентероцитів — клітини, що діляться, виявлено вздовж усієї осі системи крипта — ворсинка. Це означає не тільки посилення проліферації й міграції клітин, а й порушення їхньої диференціації, що обмежує їхнє функціонування, тим паче в умовах кровотечі, яка супроводжується ішемією та оксидативним ушкодженням, дисбалансом регуляторів і цитотоксичними ефектами лімфоцитарної інфільтрації з огляду на інфікування *H. pylori* [2].

Гостра реакція на гемостаз (через 6–12 год) супроводжувалася зростанням мікроциркуляторних порушень і набряку слизової оболонки. Наслідком цього стало посилення апоптозу в покривному епітелії, що на ворсинках набував масованого характеру. Крім того, помічено інтенсифікацію деструкції ентероцитів й експресії p53 в ендотелії судин і клітинах сполучної тканини. На цьому тлі частота Ki67⁺-клітин знижувалася за рахунок як пригнічення експресії, так і внаслідок посилення деструкції слизової оболонки. Через добу морфологічні зміни у крайовій зоні виразок хворих основної групи виявлялися розвитком гострої запальної реакції. На цьому тлі кількість Ki67⁺-клітин зростала в 1,5 разу. Клітини у стані поділу виявляли у великій кількості в ділянці крипт й у перехідній зоні, хоча експресія p53 залишалася високою. Важливо, однак, що в ділянці крипт через добу помічено стабілізацію, а через 3 доби — вірогідне зниження кількості p53-позитивних клітин.

Пригнічення апоптозу через 3 доби після зупинки кровотечі в основній групі було пов'язане зі зниженням запальної інфільтрації й кількості нейтрофілів за збільшення кількості макрофагів, фібробластів, картин проліферації ендотелію. Це, власне, відображало розвиток грануляційної тканини в крайовій зоні виразкового дефекту тканини. При цьому ПО p53⁺-клітин у покривному епітелії значно знизився, склавши (16,7 ± 4,3) й (39,3 ± 5,7) % відповідно в криптах і ворсинках. Зниження експресії p53 було асоційоване з поліпшенням мікроциркуляції, нівелюванням набряку й зменшенням дифузійної відстані між стінкою судин і епітелієм. Цікаво, що у всіх випадках виявляли асоціації між новоутвореними судинами і картинами проліферації клітин епітелію крипт і ворсинок. За рахунок цього кількість Ki67-позитивних клітин в епітеліальній пластинці слизової оболонки виросла на 43,7 % у криптах й 24,8 % — на поверхні СО та біля основи ворсинок. Це призвело до появи фено-

мена псевдобагаторядності й збільшення висоти епітеліального шару, однак при цьому зберігалось порушення просторового градієнта Ki67⁺-клітин у СО ДПК пацієнтів з виразковими кровотечами порівняно з контролем — картини проліферації виявлено як у криптах, так і на поверхні новоутворених ворсинок.

Таким чином, гостра виразкова кровотеча розвивається на тлі глибокого порушення кінетики покривного епітелію СО ДПК. Високий індекс проліферації ентероцитів супроводжується активацією апоптозу в різних тканинах стінки ДПК. На момент кровотечі показники апоптозу перевищують інтенсивність проліферації клітин, що може бути механізмом деструкції СО і розширення зони виразкового дефекту. При цьому експресія p53 охоплює різні функціональні зони системи ворсинка — крипта як на поверхні ворсинок, так і в ділянці крипт, що веде до елімінації не тільки зрілих ентероцитів, а й недиференційованих клітин, які забезпечують репарацію. Аналіз балансу процесів проліферації й диференціації в динаміці після ін'єкційного гемостазу дав змогу виявити «найнебезпечніші» терміни й процеси формування негативної кінетики. До них належать ранній період після лікувального гемостазу, коли посилюється апоптоз на тлі зростання мікроциркуляторних порушень та інгібування проліферації. Не менш серйозного аналізу вимагає й стан покривного епітелію на тлі гострої запальної реакції. Цей процес супроводжується посиленням проліферації, але з домінуванням гибелі клітин, що може зумовити дефіцит клітин покривного епітелію, функціональну неповноцінність гематоінтестинального бар'єру та порушення епітелізації поверхні виразкового дефекту.

Перспективи подальших досліджень

Представлені результати щодо зміни кінетики покривного епітелію ДПК на тлі пептичних виразок разом з дослідженням ефективності диференціювання та функціональної активності ентероцитів можуть стати основою в розробці системи діагностики та прогнозування перебігу виразкової хвороби та розвитку її ускладнень. З'ясування механізмів порушення кінетики різних популяцій клітин у покривному епітелії слизової оболонки дванадцятипалої кишки дозволить створити стратегію цілеспрямованої молекулярної корекції порушень морфогенезу та репарації слизової оболонки у хворих з ускладненим перебігом виразкової хвороби дванадцятипалої кишки.

Список літератури

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия.— М.: Медицина, 1991.— 381 с.
2. Аруин Л.И., Капуллер Л.Л., Исаков В.А. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника.— М., 1998.— 496 с.
3. Лях Ю.Е., Гурьянов Г.В., Хоменко В.Н., Панченко О.А. Основы компьютерной биостатистики.— Днепропетровск или Донецк?, 2006.— 211 с.
4. Маев И.В., Горбань В.В., Салова Л.М. Морфологические и возрастные особенности гастродуоденального кровотока у больных язвенной болезнью и пути его коррекции // Рос. журн. гепатол. и гастроэнтерол.— 2007.— № 4.— С. 7—12.
5. Филиппов Ю.А., Гайдаров Ю.А. Перспективы развития иммуногистохимических исследований в гастроэнтерологии // Журн. АМН України.— 2002.— Т. 8, № 1.— С. 69—81.
6. Basson M.D. Gut mucosal healing: is the science relevant? // Am. J. Pathol.— 2006.— Vol. 161.— P. 1101—1105.

Э.Ф. Баринов, О.Н. Сулаева

Кинетика покровного эпителия двенадцатиперстной кишки при остром язвенном кровотечении

Целью данной работы была оценка кинетики покровного эпителия двенадцатиперстной кишки при остром язвенном кровотечении. Показано, что на момент кровотечения частота апоптоза превышает суммарный уровень пролиферации клеток, что может быть механизмом деструкции слизистой оболочки и расширения зоны язвенного дефекта. При этом экспрессия p53 захватывает разные функциональные зоны системы ворсинка — крипта, снижая защитные свойства гемато-интестинального барьера и возможности репарации. В ранние сроки после эндоскопического гемостаза отмечено усиление апоптоза на фоне микроциркуляторных нарушений и ингибирования пролиферации. Через 1—2 сут в краевой зоне язвы отмечено усиление пролиферации на фоне выраженной нейтрофильной инфильтрации, интенсификации апоптоза и некроза энтероцитов.

E.F. Barinov, O.M. Sulayeva

The kinetics of the duodenal covering epithelium at acute ulcer bleeding

The aim of this work was to estimate the kinetics of duodenal covering epithelium in patients with peptic ulcer bleeding. It was shown that at acute bleeding the intensity of apoptosis was higher than the proliferation rate that could led to mucosa destruction and increase of ulcer area. By this the expression of p53 was shown to spread on the different functional zones of the villi — crypts system, thus decreasing functional properties of blood-intestine barrier and reparative potential. Early period after endoscopic hemostasis was associated with the increase of apoptosis with microcirculatory disturbance and inhibition of proliferation. After 1—2 days in the ulcer marginal layer the increased proliferation against the background of the intensive neutrophilic infiltration, apoptosis intensification and erythrocytic necrosis were observed.

Контактна інформація

Барінов Едуард Федорович, д. мед. н., проф., зав. кафедри гістології, цитології та ембріології
83003, м. Донецьк, просп. Ілліча, 16
Тел. (0622) 95-54-01. E-mail: barinoff@dsmu.edu.ua

Стаття надійшла до редакції 11 червня 2009 р.