

ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАЦИИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОДВЗДОШНОЙ КИШКИ ДЕТЕЙ С РАЗЛИЧНЫМ ТЕЧЕНИЕМ БОЛЕЗНИ КРОНА

ШУМИЛОВА О.В., КУЗНЕЦОВА Т.А.

FEATURES OF THE REGENERATION OF THE MUCOUS MEMBRANE OF THE ILEUM OF CHILDREN WITH DIFFERENT COURSE OF CROHN'S DISEASE

SHUMILOVA O.V., KUZNETSOVA T.A.

ФГБУ «ПФМИЦ» МЗ РФ, институт педиатрии, г. Нижний Новгород.

Цель исследования - изучить особенности регенерации СО кишечника при различном течении болезни Крона у детей. Материалы/пациенты: у 23 первичных больных с БК в возрасте от 3 до 18 лет ретроспективно применялся комплекс морфологического исследования слизистой оболочки подвздошной кишки. Результаты: при осложненном течении БК в СО подвздошной кишки выявлены более глубокие проявления воспалительного процесса, усугубляемые резким снижением клеток, способных к активному синтезу компонентов экстрацеллюлярного матрикса. Вывод: при неблагоприятном течении заболевания регенерация происходит с максимальным нарушением постмитотической дифференцировки клеток.

Ключевые слова: болезнь Крона, пролиферативная активность, дети.

Objective: to study features of recovery with the intestine in different currents of Crohn's disease in children. Materials / patients: in 23 patients with Crohn's disease in age from 3 to 18 years retrospectively applied a complex morphological study of the mucous membrane of the ileum. Results: in a complicated course of Crohn's disease mucous membrane of the ileum revealed deeper manifestation of the inflammatory process, compounded by a sharp decline in cells capable of active synthesis of extracellular matrix components. Conclusion: an unfavorable course of the disease the regeneration takes place with the maximum violation of postmitotic cell differentiation.

Key words: Crohn's disease, proliferative activity, and children.

Введение. Болезнь Крона (БК) – это хроническое рецидивирующее заболевание, характеризующееся трансмуральным гранулематозным воспалением с сегментарным поражением разных отделов пищеварительного тракта [1, 2]. В течение последних 15 лет отмечен неуклонный рост болезни Крона у детей, в том числе с ранней мани-

фестацией заболевания, осложненным течением и множественной локализацией патологического процесса [3].

Согласно Монреальской классификации 2005 года в зависимости от фенотипического варианта болезни Крона выделяют: воспалительную (или инфильтративную, неосложненную), стенозирующую (или стриктурирующую) и пенетрирующую (или свищевую) формы заболевания. Две последние относятся к осложненным вариантам течения БК.

При БК воспалительный процесс, начинаясь в подслизистом слое, далее распространяется на все слои кишечной стенки [4]. Центральное место среди клеток-участников воспалительного процесса занимают макрофаги, которые, по-видимому, посредством различных медиаторов, координируют и модулируют активность воспалительной реакции и процессы регенерации [5, 6]. Учитывая неоднозначный характер данных по репаративным возможностям СО кишечника при болезни Крона, данная патология остается предметом для дальнейшего пристального изучения и уточнения, особенно у детей [7-11].

Цель исследования - изучить особенности регенерации СО кишечника при различном течении болезни Крона у детей.

Материал и методы исследования. Для проведения ретроспективного исследования были отобраны 23 первичных больных с БК в возрасте от 3 до 18 лет в илеобиоптатах которых не определялась лимфоидная ткань, и выявлялся воспалительный процесс. Было сформировано 2 группы: I группа - 10 пациентов с неосложненным течением заболевания (инфильтративная форма), II группа - 13 пациентов с осложненным течением (8 пациентов со стенотической формой и 5 пациентов – со свищевой). Группу сравнения составили биоптаты пациентов с болезнью Крона, где гистологически определялась СО подвздошной кишки без выраженных воспалительных изменений (10 илеобиоптатов).

Биопсийный материал, полученный при илеоколоноскопии, фиксировали в 10% забуференном формалине подвергали стандартной

гистологической обработке, срезы окрашивали гематоксилином и эозином, альциановым синим и реактивом Шиффа. Подсчет клеточной плотности инфильтрата в строме ворсинок и межкриптално с вычислением абсолютного числа клеток на 1 мм^2 производили с помощью программного обеспечения NIS-Elements Basic Research. Иммуногистохимическое исследование с использованием Ki-67 антигена (MIB-1, «Novocastra») проводили для оценки пролиферативной активности эпителия крипт. При 400-кратном увеличении микроскопа определяли индекс пролиферации (ядерная метка Ki-67) как долю (в %) положительно окрашенных ядер эпителиоцитов в 10 случайно выбранных полях зрения. Просмотр гистологических препаратов осуществляли на микроскопе Nikon Eclipse E400.

При статистической обработке материала применяли непараметрический критерий Ман-

на-Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Описательная статистика признака была представлена медианой (Me) и интерквартильным размахом (Q25-Q75). Все полученные результаты обрабатывались с помощью пакета прикладных статистических программ Statistica 6,0.

Результаты исследования и их обсуждение. Характер и выраженность структурных изменений слизистой оболочки тонкой кишки у больных с БК обусловлены непрерывным хроническим воспалением и являются важной составляющей, определяющей характер течения данной патологии у конкретного пациента и результат регенерационного гистогенеза.

Наши исследования показали, что структурные показатели СО подвздошной кишки – высота ворсинок и глубина криптального слоя - при неосложненном течении БК достоверно не отли-

Таблица 1.

Морфометрические показатели эпителиального пласта слизистой оболочки подвздошной кишки у детей с неосложненным и осложненным течением болезни Крона

показатель	1	2	3	p_{1-2}	p_{1-3}	p_{2-3}
	группа сравнения Me [Q ₂₅ -Q ₇₅], n=10	неосложненное течение Me [Q ₂₅ -Q ₇₅], n=10	осложненное течение Me [Q ₂₅ -Q ₇₅], n=13			
высота ворсинок, мкм	425,0 [378,0-430,0]	406,0 [379,0-423,0]	324,0 [314,0-364,0]	0,570	0,003	0,016
глубина крипт, мкм	156,0 [142,0-168,0]	149,0 [140,0-163,0]	165,0 [154,0-170,0]	0,570	0,315	0,217
высота эпителия ворсинок, (мкм)	32,8 [32,0-34,0]	29,75 [29,5-30,5]	28,75 [27,5-29,5]	0,06	0,002	0,077
высота эпителия крипт, (мкм)	21,7 [20,5-24,0]	20,5 [19,25-21,25]	19,0 [18,5-21,0]	0,108	0,034	0,589
бокаловидные клетки эпителия ворсинок на 100 эпителиоцитов	19,5 [18,5-22,5]	18,5 [17,5-19,75]	16,5 [15,0-19,0]	0,186	0,071	0,203
бокаловидные клетки эпителия крипт (на 100 эпителиоцитов)	24,5 [19,0-25,0]	20,75 [18,5-22,25]	17,0 [16,5-18,0]	0,190	0,003	0,077
клетки Панета (на крипту)	6,0 [5,0-7,0]	4,25 [3,5-5,0]	2,75 [2,0-4,0]	0,038	0,002	0,090
эндокринные клетки на 1000 эпителиоцитов	6,5 [6,0-8,0]	4,75 [4,25-5,25]	1,75 [1,0-3,0]	0,011	0,001	0,024
пролиферативная активность Ki-67 (%)	27,0 [27,0 - 31,0]	34,5 [31,0 - 39,0]	32,0 [29,0 - 41,0]	0,031	0,013	0,951

Примечание: Me [Q25-Q75] –медиана и квартильный размах, n – количество пациентов

Таблица 2.

Морфометрические показатели собственной пластинки слизистой оболочки подвздошной кишки у детей с неосложненным и осложненным течением болезни Крона

Показатель (на 1 мм ²)	1	2	3	p ₁₋₂	p ₁₋₃	p ₂₋₃
	группа сравнения Me [Q ₂₅ -Q ₇₅], n=10	неосложненное течение Me [Q ₂₅ -Q ₇₅], n=10	осложненное течение Me [Q ₂₅ -Q ₇₅], n=13			
Клеточная плотность стромы ворсинок	5990,0 [5816,0-6320,0]	9637,0 [9407,0-10064,5]	12402,0 [10122,0-12773,0]	0,0082	0,0016	0,0339
Фибробласты стромы ворсин	1981,0 [1903,0-2139,0]	1823,0 [1735,5-1926,5]	1984,5 [1797,0-2322,0]	0,0588	0,9223	0,3222
Фibroциты стромы ворсин	862,0 [827,0-915,0]	1311,5 [1151,5-1514,5]	1633,5 [1327,0-2214,0]	0,0082	0,0006	0,2579
Макрофаги стромы ворсин	397,0 [368,0-413,0]	486,5 [451,0-513,5]	395,0 [345,0-439,0]	0,0140	0,6963	0,0477
Лимфоциты стромы ворсинок	1544,0 [1444,0-1727,0]	2630,0 [2488,5-2713,5]	3497,5 [3255,0-3721,0]	0,0082	0,0006	0,0047
Плазмоциты стромы ворсинок	426,0 [342,0-530,0]	2191,0 [2005,0-2340,0]	2784,5 [2243,0-3224,0]	0,0082	0,0006	0,0562
Эозинофильные гранулоциты стромы ворсинок	178,0 [152,0-192,0]	479,0 [424,0-516,0]	451,5 [406,0-508,0]	0,0082	0,0006	0,7773
Нейтрофильные гранулоциты стромы ворсинок	24,0 [13,0-42,0]	152,0 [125,0-183,0]	330,0 [244,0-376,0]	0,0082	0,0006	0,0162
Клеточная плотность межкрипально	5844,0 [5683,0-6518,0]	8920,5 [8661,0-9356,5]	12464,0 [8738,0-13426,0]	0,0082	0,0006	0,2579
Фибробласты межкрипально	1944,0 [1835,0-2086,0]	1859,0 [1755,0-1938,0]	1913,5 [1747,0-2415,0]	0,2986	0,9223	0,3222
Фibroциты межкрипально	1012,0 [934,0-1167,0]	1416,5 [1255,5-1576,0]	1898,0 [1126,0-2371,0]	0,0082	0,0054	0,6714
Макрофаги межкрипально	449,0 [407,0-512,0]	505,0 [469,0-529,0]	406,0 [382,0-452,0]	0,3447	0,1432	0,0237
Лимфоциты межкрипально	1428,0 [1372,0-1772,0]	2405,5 [2349,5-2480,5]	3203,0 [2442,0-3981,0]	0,0082	0,0006	0,1198
Плазмоциты межкрипально	514,0 [382,0-630,0]	1763,5 [1696,0-1866,0]	2781,0 [1883,0-2967,0]	0,0082	0,0006	0,0660
Эозинофильные гранулоциты межкрипально	156,0 [138,0-172,0]	433,5 [368,5-482,5]	441,5 [387,0-485,0]	0,0082	0,0006	0,6714
Нейтрофильные гранулоциты межкрипально	29,0 [13,0-41,0]	138,5 [128,5-167,0]	321,0 [283,0-355,0]	0,0082	0,0006	0,0109

Примечание: Me [Q₂₅-Q₇₅] – медиана и квартильный размах, n – количество пациентов

чаются от данных показателей группы сравнения. При осложненном течении болезни выявлено достоверное снижение высоты ворсинок (406,0 мкм [379,0-423,0], 425,0 мкм [378,0-430,0]; $p=0,030$), сопровождаемое снижением высоты их эпителия ($p=0,002$). Базальная мембрана эпителия в данной группе сохраняла свою четкость и шик-позитивную окраску лишь в 37% случаев, в 63 % случаев отмечалась ее разрыхленность и альцианофилия.

Морфометрическое исследование эпителиального пласта показало при неосложненном течении заболевания угнетение наиболее долгоживущих высокоспециализированных клеток: клеток Панета ($p=0,038$) и эндокринных клеток ($p=0,011$). Бокаловидные клетки сохраняли свою численность, но при этом изменялся профиль синтезируемых ими муцинов – секрет бокаловидных экзокриноцитов приобретал альцианофильную окраску.

При осложненном течении заболевания достоверно снижалось количество всех видов высокоспециализированных клеток: бокаловидных экзокриноцитов – в 1,5 раза, причем лишь единичные из них (до 8%) имели ШИК-позитивную окраску, остальные имели окраску смешанного типа (57%) и альцианофильную окраску (35%), клеток Панета – в 2,2 раза, энтероэндокринных клеток – в 4,3 раза, последние имели достоверную разницу в зависимости от течения заболевания ($p=0,024$).

Сравнительный анализ инфильтрации эпителиального пласта ворсинок выявил и в I и во II группах достоверное повышение межэпителиальных лимфоцитов ($p=0,04$ и $p=0,009$, эозинофильных гранулоцитов ($p=0,011$ и $p=0,0006$) и нейтрофильных гранулоцитов ($p=0,047$ и $p=0,002$). Достоверное повышение инфильтрации криптального эпителия эозинофильными гранулоцитами выявлено в обеих группах ($p=0,0082$ и $p=0,0006$), а увеличение числа межэпителиальных лимфоцитов ($p=0,0015$) и нейтрофильных гранулоцитов ($p=0,0011$) отмечалось лишь при осложненном течении заболевания.

Анализ собственной пластинки СО подвздошной кишки выявил, что еще в начале болезни, в период до развернутой клинической картины и развития осложнений при различном течении болезни Крона, имеются значительные различия морфометрических показателей. Так в группе детей с осложненным течением болезни Крона клеточная плотность воспалительного инфильтрата по отношению к этому показателю у детей I группы была выше в 1,3 раза ($p=0,039$). В инфильтрате преобладали клетки лимфо-плазмочитарного ряда с присутствием нейтрофильных и эозинофильных гранулоцитов (табл. 2), что характеризует клеточное окружение в очаге воспаления

и определяет угнетение клеток - продуцентов экстрацеллюлярного матрикса: зрелых фибробластов, обладающих выраженной синтетической активностью, тучных клеток, ассоциированных с базальными мембранами эпителия, продуцирующие гепарансульфатный протеогликан. При неосложненном течении заболевания отмечено достоверно более высокое содержание макрофагов.

Заключение. Нарушение соотношения клеток – продуцентов экстрацеллюлярного матрикса к клеткам инфильтрата, снижение стабильности эпителиального пласта определяют изменение регенераторного процесса при болезни Крона. Показатель пролиферативной активности регенераторной зоны крипт был достоверно выше в участках с выраженным воспалением: при неосложненном течении он повышался на 28% ($p=0,031$), при осложненном – на 18,5% ($p=0,013$). В рамках данного исследования нами не установлено достоверной разницы этого показателя в зависимости от течения болезни Крона. Однако, выявленное повышение пролиферативной регенераторной зоны крипт с целью восполнения структурной целостности эпителиального пласта при неблагоприятном течении заболевания происходит с максимальным нарушением постмитотической дифференцировки клеток, проявляемое достоверным снижением всех видов высокоспециализированных энтероцитов.

Важным критерием полноценной регенерации ткани является восстановление ее морфофункциональных единиц. Стимуляция пролиферативных процессов в условиях хронического воспаления при болезни Крона не приводит к полноценному восстановлению эпителиального пласта, а гиперрегенераторная реакция в эпителии может рассматриваться как неспецифический механизм адаптации. Стойкое рассогласование эпителиально-соединительнотканых взаимодействий у детей с неблагоприятным течением болезни Крона, сопровождается снижением количества и качества высокоспециализированных клеток эпителия и приводит к потере специализации поврежденной ткани, что свидетельствует о длительном нарушении ее функциональных возможностей.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Потапов А.С., Алиева Э.И., Габрузская Т.В., Горелов А.В., Захарова И.Н., Корниенко Е.А., Панфилова В.Н., Печкуров Д.В., Ратникова М.А., Ревнова М.О., Ситникова Е.П., Урсова Н.И., Федулова Э.Н., Цимбалова Е.Г., Шумилов П.В., Щербакова О.В., Щиголева Н.Е. Клиническая картина, диагностика и лечение язвенного колита у детей: Российский педиатрический консенсус. Вопросы современ-

- ной педиатрии. 2013; 12 (3): 18-30.
2. Abraham C., Cho J.H. Inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.* 2009; 361: 2066-2078.
3. Федулова Э.Н. Клинико-патогенетические особенности язвенного колита и болезни Крона у детей: диагностика, прогнозирование и лечение: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Н.Н., 2013. 32 с.
4. Василенко, И.В. Морфологическая диагностика болезни Крона / И.В. Василенко // Гастроэнтерология: тематический номер «Новости медицины и фармации». – 2011. – № 358. – С. 37-43.
5. Friedl P., Wolf K. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J. Cell. Biol.* 2010; 188: 11-19.
6. Конович, Е.А. Иммунопатогенез воспалительных заболеваний кишечника / Е.А. Конович, И.Л. Халиф, М.В. Шапина // РЖГГК. - 2013. - Т.23. - №4. - С.69-78.
7. Федулова, Э.Н. Варианты течения язвенного колита у детей: прогнозирование и определение тактики лечения / Э.Н. Федулова, О.А. Тутина, О.В. Федорова, П.П. Потехин, В.Н. Копейкин // Педиатрическая фармакология. – 2009. – Т. 6, № 3. – С. 111-119.
8. Потехин, П.П. Роль морфологического исследования в диагностике язвенного колита у детей / П.П. Потехин, В.П. Обрядов, Г.М. Лукьянова, Е.А. Рожденкин, Э.Н. Федулова, А.Р. Богомолов, Т.А. Кузнецова, Г.В. Медянцева // Современные медицинские технологии. – 2010. – № 1. – С. 45-49.
9. Федулова, Э.Н. Клинический аспект морфологических критериев для прогнозирования течения язвенного колита у детей и индивидуализации лечения / Э.Н. Федулова, П.П. Потехин, Т.А. Кузнецова, О.В. Федорова, О.А. Тутина, О.В. Шумилова // Колопроктология. – 2012. – № 2. – С. 21-29.
10. Способ прогнозирования течения неспецифического язвенного колита у детей. П.П. Потехин, Э.Н. Федулова: пат. RUS №2192784 27.04.2001
11. Некоторые морфологические критерии прогнозирования степени тяжести течения болезни Крона у детей. Э.Н. Федулова, Е.А. Жукова, О.А. Тутина, Т.А. Кузнецова, О.В. Шумилова, О.В. Фёдорова. Вопросы современной педиатрии. 2013; 12 (5): 108–111.