

О.Н.Сулаева  
Э.Ф.Баринов  
Л.Н.Игнатьева  
Е.В.Баранова

Донецкий национальный  
медицинский университет  
им. М.Горького

**Ключевые слова:** кишка,  
язвенное кровотечение,  
апоптоз.

Надійшла: 04.06.2009

Прийнята: 15.07.2009

## ЭКСПРЕССИЯ p53 В КЛЕТКАХ КРАЕВОЙ ЗОНЫ ЯЗВЕННЫХ ДЕФЕКТОВ ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ ПРИ ОСТРОМ КРОВОТЕЧЕНИИ

*Исследование проведено в рамках научно-исследовательской работы «Вивчити роль внутрішньоклітинних сигнальних систем під час реалізації запально-репаративних процесів в органах, що забезпечують гомеостаз організму» (№ державної неестрації 0106U01840)*

**Резюме.** Целью работы явилась оценка выраженности и тканевого распределения экспрессии проапоптогена p53 в слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки у больных с кровотечениями из пептических язв ДПК. У 31 пациента после эффективного гемостаза наблюдалось заживление язвенного дефекта (1 группа), у 15 больных имело место повторное кровотечение (2 группа). Проведенное иммуноцитохимическое исследование показало, что развитие острого язвенного кровотечения происходило на фоне активации апоптоза клеток краевой зоны, наиболее выраженного в покровном эпителии и эндотелии сосудов. У пациентов с повторными кровотечениями отмечены более высокие показатели экспрессии p53 в эпителии крипт и эндотелии дилатированных сосудов, на фоне выраженного отека и инфильтрации собственной и мышечной пластинок лимфоцитами с перифокальной активацией гибели клеток. При этом помимо апоптоза, во 2-й группе имели место деструкция клеток путем некроза и картины десквамация эпителиального пласта, отражающие дезинтеграцию тканевых элементов слизистой двенадцатиперстной кишки.

**Морфология.** – 2009. – Т. III, № 3. – С. 116-119.

© О.Н.Сулаева, Э.Ф.Баринов, Л.Н.Игнатьева, Е.В.Баранова, 2009

Sulayeva O.N., Barinov E.F., Ignatyeva L.N., Baranova K.V. The p53 expression in cells of marginal zone of duodenal ulcers during acute bleeding.

**Summary.** The aim of the work was to estimate the intensity and tissue distribution of proapoptogen p53 expression in duodenal mucosa in patients with acute bleeding caused by peptic ulcers. In 31 patients (1<sup>st</sup> group) the healing of ulcer was detected after effective endoscopic hemostasis and in 15 patients rebleeding took place (2<sup>nd</sup> group). Performed immunocytochemical investigation allow to determine that acute ulcer bleeding was associated with activation of marginal zone cells apoptosis which was maximal in covering epithelium, vascular endothelium and regions infiltrated by lymphocytes. In patients with rebleeding the higher values of p53 expression were detected in crypts epithelium and in endothelium of dilatating vessels accompanied with intensive edema and lymphocytes infiltration of lamina propria and muscularis mucosae with perifocal activation of cells death. Additionally to apoptosis in 2<sup>nd</sup> group duodenum the necrosis of cells and epithelium desquamation were found, reflecting the tissue disintegration of duodenal mucosa.

**Key words:** duodenum, ulcer bleeding, apoptosis.

### Введение

Гистологическая диагностика дизрегенераторных нарушений в стенке двенадцатиперстной кишки (ДПК) при язвенной болезни, выполняемая при исследовании биоптатов, нуждается сегодня в повышении доказательности морфологических заключений (Аруин Л.И., 1998). В первую очередь это касается экстремальных ситуаций, возникающих в практике гастроэнтерологов и хирургов – при острых кровотечениях из язвенных дефектов. Разработанные на сегодняшний день бальные системы прогнозирования рецидива кровотечения валидны при крайних ситуациях – при кровотечении из артериальных сосудов или размерах язвы более 2 см (Basson M.D., 2002). Более информативным может стать

гистологическое изучение биоптатов, позволяющее оценить глубину дезинтеграции тканевых элементов стенки ДПК на момент кровотечения и эффективность реализации разных фаз раневого процесса. Однако существующая ситуация на сегодняшний день вряд ли может быть расценена как приемлемая или утешительная – при обилии информации касательно патоморфологических изменений слизистой оболочки (СО) нет критериев оценки тяжести дизрегенераторных нарушений, морфологических детерминант развития рецидивов кровотечений, что ограничивает понимание механизмов их реализации и разработку адекватной системы коррекции. Одним из камней преткновения является феномен нарушения репарации при усилении пролиферации клеток

(Аруин Л.И., 1998, Филиппов Ю.А., 2002). Среди основных причин развития этого феномена обсуждается роль нарушения дифференцировки клеток и усиление апоптоза. Визуализацию последнего процесса, как правило, связывают с экспрессией ключевых проапоптогенов – p53 и bax. К сожалению, представленная информация не касается специфики экспрессии проапоптогенов в клетках разных линий, резистентность различных тканей к патогенетическим факторам, индуцирующим развитие кровотечения. Это затрудняет интерпретацию причинно-следственных отношений между нарушением реализации морфогенетических процессов в зоне язвы и развитием ранних и поздних рецидивов кровотечений (Маев И.В., 2007).

**Целью** данной работы явилось исследование выраженности, тканевого распределения и динамики экспрессии p53 в краевой зоне язвенных дефектов двенадцатиперстной кишки при кровотечении.

#### **Материал и методы**

В работе проведен морфологический анализ биоптатов краевой зоны язв ДПК 46 пациентов в возрасте  $54 \pm 8,6$  лет с острыми кровотечениями. Длительность заболевания составила в среднем  $6,3 \pm 3,1$  года. Всем больным проведена диагностическая эзофагогастродуоденоскопия по общепринятой методике с использованием аппарата GIF Q 40 «Olympus». Во время выполнения эндоскопии с помощью стандартных биопсийных щипцов типа ФВ-23К брали биоптаты слизистой оболочки из краевой зоны язвенного дефекта. Забор и оценку биоптатов производили на момент госпитализации до выполнения эндоскопического гемостаза. Материал фиксировали в нейтральном забуференном формалине (pH 7,4) в течение 24 часов. После дегидратации кусочки заливали в высокоочищенный парафин с полимерными добавками (Richard-Allan Scientific, США) при температуре не выше  $60^{\circ}\text{C}$ . Срезы толщиной 5 мкм выполняли на ротационном микротоме Microm HM325 с системой переноса STS (Carl Zeiss, Германия). По 3 среза помещали на покрытые адгезивом стекла Super Frost Plus (Menzel, Германия). Для «демаскирования» антигенов регидратированные срезы подвергали термической обработке в растворе Target Retrieval Solution (DAKO, Дания) с использованием бытовой микроволновой печи Samsung CE118KFR. После блокирования эндогенной пероксидазной активности пероксидазным блоком (DAKO) и неспецифического связывания белков протеиновым блоком (DAKO) наносили первичные антитела. Для анализа апоптоза клеток использовали моноклональные антитела (МАТ) к p53 соответственно (DAKO). Визуализацию первичных антител проводили с помощью полимерной системы детекции DAKO EnVision+. В качестве субстрата для пероксидазы хрена использовали

DAB+ (DAKO). Препараты докрашивали гематоксилином Майера (Филиппов Ю.А., 2002). Далее окрашенные срезы заключали в полусинтетическую среду Permanent Mounting Medium (DAKO).

В зависимости от исхода, всех больных разделили на две группы. В 1-ю группу вошли пациенты с позитивной динамикой и заживлением язвенного дефекта ( $n=31$ ). 2-ю группу составили больные, у которых развивались повторные кровотечения из язв ( $n=15$ ). Помимо описательной морфологии использовался количественный метод оценки с помощью морфометрического анализа. При анализе эпителия слизистой оболочки оценивали его толщину на ворсинках и в криптах, плотность эпителиоцитов на единицу длины БМ, удельный вес бокаловидных клеток, процент клеток с явлениями вакуолизации и деструкции, удельную плотность p53<sup>+</sup> клеток. В собственной пластинке слизистой оболочки с помощью квадратно-узловой тест-системы оценивали удельные объемы (УО) и диаметры сосудов, клеток, межклеточного вещества и его компонентов. При наличии лейкоцитарной инфильтрации подсчитывали УО лейкоцитов и клеточный состав инфильтратов (Автандилов Г.Г., 1991). Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием пакета прикладных компьютерных программ (Лях Ю.Е., 2006).

#### **Результаты и их обсуждение**

Краевая зона язв ДПК на момент кровотечения характеризовалась нарушениями рельефа. Наиболее часто регистрировалось снижение высоты ворсинок и глубины крипт. В биоптатах пациентов 2-й группы часто отмечалось разрушение ворсинок и деструкция покровного эпителия. В сохраненном покровном эпителии ворсинок зарегистрировано увеличение высоты клеток за счет отека и вакуолизации, с частой дислокацией ядер. В криптах ДПК обеих групп отмечалось увеличение количества бокаловидных клеток по сравнению с контролем. У пациентов 2-й группы в отдельных криптах обнаружен отрыв эпителиального пласта от базальной мембраны. Причем УО клеток с явлениями выраженной вакуолизации и деструкции в 1-й группе составил  $47,8 \pm 3,2\%$  на ворсинках и  $29,4 \pm 3,5\%$  в области крипт. Тогда как во 2-й группе эти показатели составили соответственно  $64,8 \pm 12,2\%$  и  $45,6 \pm 4,3\%$ .

Иммуноцитохимическое исследование позволило выявить интенсивность и тканевую специфику распределения экспрессии проапоптогена p53. В 1-й группе наиболее выраженная экспрессия p53 наблюдалась в покровном эпителии. В меньшей степени в экспрессии p53 вовлекался эндотелий кровеносных сосудов, а затем – клетки собственной пластинки слизистой оболочки (СО). В 1-й группе УО p53<sup>+</sup> клеток в эпителии поверхностной зоны (ворсинки, сгла-

женный рельеф) составил  $37,3 \pm 15,4\%$ , хотя в области крипт этот показатель был ниже –  $21,1 \pm 6,5\%$ . В большинстве случаев экспрессия p53 наблюдалась в клетках с явлениями вакуолизации, которая охватывала как апикальную, так и базальную поверхности клеток. Последнее вело к смещению ядер и появлению феномена псевдомногорядности. В сохраненном покровном эпителии ворсинок и крипт зарегистрировано увеличение количества бокаловидных клеток по сравнению с контролем. Более выраженные нарушения отмечались во 2-й группе – на ворсинках p53<sup>+</sup> клетки составляли  $60,2 \pm 16,4\%$  от общего количества эпителиоцитов, тогда как в криптах этот показатель достигал  $41,7 \pm 6,1\%$ .

Изменения в покровном эпителии во многом были связаны с нарушением микроциркуляции в собственной пластинке. Так, в 1-й группе УО сосудов в области ворсинок и крипт был соответственно на 48% ( $p < 0,01$ ) и 14,08% ( $p < 0,05$ ) выше контрольных значений. Во 2-й группе прирост УО сосудов в ворсинках и криптах составил соответственно 66,67% и 33,8% в сравнении с контролем. Нарушение микроциркуляции коррелировало с выраженностью отека ( $r = 0,438$ ;  $p < 0,05$ ) и УО p53<sup>+</sup> клеток в покровном эпителии ( $r = 0,718$ ;  $p < 0,001$ ). Характерно, что во 2-й группе в ряде биоптатов выявлялась массивная инфильтрация СО лимфоцитами с формированием диффузных скоплений и узелков. Наиболее типичным было расположение инфильтратов в области между криптами и на уровне диссоциированной мышечной пластинки. Лишь единичные лимфоциты в их составе имели признаки экспрессии p53, но вокруг инфильтратов количество p53-позитивных клеток было высоким (в 2–2,5 раза выше, чем в зонах, свободных от инфильтратов).

Таким образом, развитие острого язвенного кровотечения сопровождается активацией апоптоза в различных тканях стенки ДПК. На момент кровотечения выявлены вариабельные показатели апоптоза. У пациентов с повторными кровотечениями отмечены более высокие показатели экспрессии проапоптогена в покровном эпителии и эндотелии сосудов. Кроме того, предрасполагающим фактором развития рецидива является выраженная инфильтрация слизистой в области вокруг крипт и на уровне мышечной пластинке, с перифокальной активацией гибели клеток. При этом помимо апоптоза, во 2-й группе имели место деструкция клеток путем некроза и полная десквамация эпителиального пласта.

Интенсивность экспрессии p53 отражает не столько усиление запрограммированной клеточной гибели, сколько свидетельствует об активации экстренных программ клетки на повреждение. Это обусловлено функциональным значением гена и белка p53, экспрессия которого обеспечивает адекватную реакцию клетки на

действие интенсивных повреждающих факторов. При этом эффект активации p53 определяется исходным состоянием клеток и их отношением к клеточному циклу. Ключевыми причинными факторами активации p53 считаются нарушение интактности генома (мутагенез), энергодифицит и оксидативное повреждение, дисбаланс регуляторов и нарушение экспрессии факторов выживания клеток разных линий. Применительно к острым язвенным кровотечениям, факторами, способствующими активации экспрессии p53, могут быть ишемия и оксидативное повреждение, связанные с микроциркуляторными нарушениями, эффектами *H. pylori*, нарушением баланса факторов роста и локальных регуляторов (в том числе цитопротекторов – NO, ПГ, мелатонина).

Как показано выше, на момент кровотечения экспрессия p53 была максимальной в покровном эпителии, причем в наиболее поверхностных слоях. Это, по сути, отражает максимальную чувствительность эпителиоцитов к фактору ишемии и дизрегуляции, имеющим место при остром язвенном кровотечении, и привлекает максимальное внимание к сохранности эпителиального пласта краевой зоны язв, тем более учитывая его роль в эпителизации поверхности язвенного дефекта. Не менее важным является фактор пространственного распределения апоптоза в эпителии. Так, во 2-й группе, помимо поверхности СО, активация экспрессии p53, усиливалась в зоне крипт, что учитывая локализацию здесь стволовых клеток, может рассматриваться как фактор риска развития рецидива кровотечения. Стоит также отметить факт ассоциации апоптоза клеток собственной и мышечной пластинок слизистой оболочки с лимфоцитарной инфильтрацией в стенке ДПК. Это может не только отражать роль инфицирования слизистой *H. pylori*, но и возможность цитокиновой индукции экспрессии p53 в клетках СО ДПК.

В интерпретации полученных данных важно учитывать, что речь идет о краевой зоне язвы, являющейся источником и направляющей закрытия язвенного дефекта за счет грануляционной ткани и процесса эпителизации. Развитие грануляций происходит на фоне усиления PDGF, VEGF, FGFb (Аруин Л.И., 1998; Basson M.D., 2002), простагландинов и оксид азота, простагландины, а также ряда цитокинов, включая ИЛ-1 и ИЛ-6 (Маев И.В., 2007). Продуктами данных факторов роста и цитокинов являются тромбоциты, моноциты-макрофаги, эндотелиоциты и миофибробласты, претерпевающие ряд регуляторных изменений условиях эндотелиальной дисфункции и иммунотропных эффектов *H. pylori*. В связи с этим весьма вероятны нарушения локальной продукции регуляторов, контролирующих параметры клеточного цикла столбчатых энтероцитов. Важным аспектом элиминации

клеток в области краевой зоны язвы является характер их гибели и соотношение между процессами апоптоза и некроза, определяющее, по сути, реакцию окружающих тканей и выраженность последующей воспалительной реакции. Превалирование клеточной гибели над процессами новообразования клеток, сосудов и матрикса в области края детерминирует негативный баланс клеточных популяций, а также может вести к расширению и углублению язвенного дефекта.

#### **Заключение**

Таким образом, на момент кровотечения экспрессия p53 была максимальной в покровном эпителии ворсинок, отражая высокую чувстви-

тельность к фактору ишемии и дизрегуляции. Увеличение количества клеток, вовлеченных в апоптоз, сопряжено с высоким риском развития рецидива кровотечения. Не менее важным является факт увеличения частоты апоптоза клеток собственной и мышечной пластинок слизистой оболочки в зонах лимфоцитарной инфильтрацией в стенке ДПК.

#### **Перспективы дальнейших разработок**

Точное выяснение перечисленных патогенетических факторов усиления апоптоза в клетках ДПК может стать основой разработки стратегии патогенетически обоснованной коррекции дизрегуляторных нарушений при ЯБ ДПК.

### **Литературные источники**

Автандилов Г. Г. Медицинская морфометрия / Автандилов Г. Г. – М. : Медицина, 1991. – 381 с.

Аруин Л. И. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника / Л. И. Аруин, Л. Л. Капуллер, В. А. Исаков. – М. – 1998. – 496 с.

Маев И. В. Морфологические и возрастные особенности гастродуоденального кровотока у больных язвенной болезнью и пути его коррекции / И. В. Маев, В. В. Горбань, Л. М. Салова // Рос. журн. гепат. и гастроэнтерол. – 2007. – №4. – С. 7-12.

Основы компьютерной биостатистики / Ю. Е. Лях, Г. В. Гурьянов, В. Н. Хоменко, О. А. Панченко. – Д. – 2006. – 211 с.

Филиппов Ю. А. Перспективы развития иммуногистохимических исследований в гастроэнтерологии / Ю. А. Филиппов, Ю. А. Гайдар // Журнал АМН України. – 2002. – Т.8, № 1. – С.69-81.

Basson M. D. Gut mucosal healing: is the science relevant? / M. D. Basson // Am. J. Pathol. – 2002. – Vol. 161. – P. 1101–1105.

**Суласва О.Н., Баринов Е.Ф., Ігнатська Л.Н., Баранова Е.В. Експресія p53 у клітинах крайової зони виразкових дефектів дванадцятипалої кишки при розвитку гострої кровотечі.**

**Резюме.** Метою роботи стала оцінка виразності та тканинного розподілу експресії проапоптогену p53 в слизовій оболонці дванадцятипалої кишки у хворих з гострими кровотечениями з пептичних виразок дванадцятипалої кишки. В 31 пацієнта після ефективного гемостазу спостерігалось гоєння виразкового дефекту (1 група), у 15 хворих зареєстровано розвиток повторної кровотечі (2 група). Проведене імуноцитохімічне дослідження дозволило з'ясувати, що розвиток гострої виразкової кровотечі відбувається на фоні активації апоптоза клітин крайової зони, найбільш інтенсивне в покривному епітелії та ендотелії судин. У пацієнтів з повторними кровотечениями зареєстровані більш високі значення експресії p53 та ознаки некрозу в покривному епітелії крипт, явища стази та виразного набряку. Крім того, для хворих 2-ї групи типовою ознакою було наявність виразної інфільтрації слизової оболонки в ділянці навколо крипт та на рівні м'язової пластинки, що супроводжувалося перифокальною активацією гібелі клітин.

**Ключові слова:** дванадцятипала кишка, виразкова кровотеча, апоптоз.