

Роль протективных факторов слизистой оболочки желудка в морфогенезе хронических язв, осложненных кровотечением

Э. В. Яковлева², С. И. Мозговой¹, А. В. Кононов¹

¹ Омская государственная медицинская академия Росздрава,

² ГУЗОО Областная клиническая больница, г. Омск

Role of protective factors of the gastric mucosa in the morphogenesis of the chronic bleeding ulcers

E. V. Yakovleva, S. I. Mozgovoy, A. V. Kononov

Omsk State Medical Academy, Omsk

Резюме

На материале резецированных по поводу язвы с кровотечением желудков 30 больных в возрасте от 30 до 74 лет изучена роль протективных факторов слизистой оболочки в морфогенезе хронических язв, осложненных кровотечением. Группа сравнения — операционный и биопсийный материал от больных в возрасте 30–59 лет с хроническими язвами, не осложненными кровотечением. Установлены особенности экспрессии желудочных муцинов MUC5AC, MUC6 в наружном крае язвенных дефектов, и их взаимоотношения со степенью зрелости фибрина дна язв при кровотечении. В крае язвы, осложненной кровотечением, выявлено снижение продукции протекторного муцина MUC5AC у лиц 30–59 лет, что может быть использовано в качестве дополнительного маркера риска осложненного течения хронической язвы.

Ключевые слова: язва желудка, гастроинтестинальные муцины, кровотечение, фибрин.

Summary

The role of protective factors of gastric mucosa in a morphogenesis of the chronic bleeding ulcer are investigated on the material of 30 resected ulcers of patients in the age 30–74 years Group of comparison — surgical and biopsy material from patients in the age 30–59 years with the chronic ulcers which have been not complicated with a bleeding. Expression of gastric mucins MUC5AC and MUC6 in external margin of ulcerative defects, and their relationship with a degree of a maturity of a fibrin in the bottom of bleeding ulcers are revealed. In the margin of bleeding ulcer low level of MUC5AC production is detected at persons of 30–59 years that can be used as an additional marker of ulcer bleeding risk.

Key words: stomach ulcer, gastrointestinal mucins, bleeding, fibrin.

Введение

Основными цитопротективными факторами слизистой оболочки желудка (СОЖ) являются: слой прикрепленной слизи с наличием секреторных желудочных муцинов (MUC5AC, MUC6); должный уровень клеточного обновления; достаточный уровень васкуляризации и кровотока; продукция простагландинов, эпидермального фактора роста, трансформирующего фактора роста- α [8, 9, 10, 14, 15]. Важным с точки зрения морфогенеза и практического использования является понимание механизмов взаимодействия данных факторов протекции при репарации язвы [2, 3, 20, 21].

При наличии длительно существующего язвенного дефекта представления о протекции дополняются формированием зоны фибриноидного некроза, роль которого неоднозначна в

процессах хронизации и заживления язв [2, 3]. Фибриноид препятствует полноценной эпителизации и поэтому служит одним из факторов, ведущих к хроническому течению язв. В то же время фибриноид обеспечивает защиту стенки желудка, лишенной эпителиального покрова [2, 3, 20, 22]. Высказано предположение о возможной протективной роли фибрина в развитии и рецидивировании язвенного кровотечения [13].

Целью исследования являлось определение роли протективных факторов СОЖ и особенностей фибриноидного некроза в морфогенезе хронических язв, осложненных кровотечением.

Материалы и методы

Основную группу составили 30 резецированных желудков от больных в возрасте от 30 до 74 лет. Показанием к оперативному вмеша-

С. И. Мозговой — кандидат медицинских наук;

А. В. Кононов — доктор медицинских наук, профессор.

тельству послужило кровотечение из язвы. Группа была подразделена на 2 подгруппы: 1 — больные в возрасте 30-59 лет (23), 2 — больные в возрасте 60-74 лет (7), согласно рекомендациям ВОЗ по определению возрастных категорий [12]. Макроскопическое исследование операционного материала с последующим забором фрагментов ткани проводилось с использованием гистотопографического принципа согласно рекомендациям: после фиксации целого желудка вырезались по 2-6 фрагментов ткани из дна, на расстоянии 1 см от края язвы и на расстоянии 3 и 5 см от язвенного дефекта [18]. Группу сравнения составили операционный (8 резецированных желудков) и биопсийный (145 гастробиоптатов) от больных в возрасте 30-59 лет с хроническими язвами, не осложненными кровотечением. Гастробиоптаты от 40 больных забирались эндоскопически по 3-4 фрагмента из тела и антрального отдела желудка с обязательным наличием фрагментов в 1 см от края язвенного дефекта; затем фиксировались в 10%-ом нейтральном забуференном формалине (pH=7,2-7,4) в течение 12-24 часов, и заливались в парафин по общепринятой методике. Парафиновые срезы толщиной 5-7 мкм окрашивались гематоксилином и эозином.

Иммуногистохимическая оценка муцинпродуцирующей способности эпителия проводилась на материале СОЖ, взятом в пределах 1 см от края язвенного дефекта. Для выявления зрелости фибрина вырезались 2-4 пластинки ткани из дна язвенных дефектов.

Гистохимическое исследование. Для оценки степени зрелости фибрина в дне хронических язв были использованы методики окраски Marcius-scarlett-blue и Picro-Mallory V [7]. Зрелость фибрина оценивали в зависимости от сроков его образования, и характеризовалась «молодым» и «зрелым» фибрином, окрашенным в оранжевый и красный цвета (время образования до 18 часов) и «старым» фибрином, окрашенным в «синий» цвет (время образования от 18-24 часов). Для полуколичественной оценки степени зрелости фибрина использовали следующую шкалу: 1 — присутствует только «молодой» и «зрелый», фибрин; 2 — преобладает «молодой» и «зрелый» фибрин, но присутствует «старый» фибрин; 3 — равное количество «молодого», «зрелого» и «старого» фибрина; 4 — преобладает «старый» фибрин, но присутствует «молодой» и «зрелый» фибрин; 5 — присутствует только «старый» фибрин.

Иммуногистохимическое исследование выполняли на парафиновых срезах с применением непрямого стрептавидин-биотинового метода с пероксидазной меткой («ДАКО», Дания, LSAB2 Systems, HRP). Демаскировку антигена проводили в цитратном буфере (pH =

6,0) на водяной бане в течение 1 часа. В качестве первичных антител использовались мышинные моноклональные антитела: MUC 5AC; клон CLH2; MUC6, клон CLH5 («Novocastra», Великобритания) в разведении 1:100, согласно рекомендациям фирмы-производителя. В систему визуализации «LSAB2 Systems, HRP» («ДАКО», Дания) входили биотилированные антитела второго слоя и стрептавидин, меченый пероксидазой. В качестве хромогена использовали 3,3-диаминобензидина тетрагидрохлорид. Ядра клеток докрашивались гематоксилином Майера в течение 30 секунд-2 минут. Для оценки экспрессии MUC5AC и MUC6 применяли показатель распространенности экспрессии муцинов (РЭ): определение доли (в процентах) положительно окрашенных эпителиоцитов СОЖ в покровно-язочном эпителии и в железах с присвоением значения от 1 до 10 по следующей градации: 1 — до 10%; 2 — 11-20%; 3 — 21-30%; 4 — 31-40%; 5 — 41-50%; 6 — 51-60%; 7 — 61-70%; 8 — 71-80%; 9 — 81-90%; 10 — 91-100%. Применение данных способов подсчета было обусловлено широким применением различных вариантов в серии публикации последних лет [6, 16, 19, 25], как достаточно точно отражающих интенсивность и распределение различных муцинпозитивных зон.

Статистические методы. Для статистического сравнения экспрессии желудочных муцинов в 2 группах применяли Т-критерий Манна-Уитни [5]. Для выявления взаимосвязей между изучаемыми факторами использовался метод корреляционного анализа — метод ранговой корреляции Спирмена и критерий его достоверности [1, 4]. Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием стандартных пакетов Microsoft Excel 2000, Biostat и программы Statistica 6.0 for Windows на персональном компьютере на основании общепринятых методов вариационной статистики. При создании базы использовался редактор электронных таблиц MS Excel 7.0. Просмотр и фотографирование микропрепаратов осуществлялось на микроскопе Axioskop 40 (Carl Zeiss, Германия) с помощью камеры AxioCam MRc5 (Carl Zeiss, Германия).

Результаты исследования

Оценка показателей экспрессии желудочных муцинов в эпителии наружного края хронических язв в исследуемых группах позволила установить следующие феномены.

При сравнении показателя РЭ MUC5AC в 2 группах была обнаружена выраженная вариабельность данного показателя в группе с язвенным кровотечением (рис. 1, а, в, см. цв. вкладку). Группа без кровотечения характеризовалась более однородными показателями,

показатель РЭ по MUC5AC был достоверно ($p=0,013$) выше при сопоставлении пациентов возрастной группы 30-59 лет (рис. 1, а, см. цв. вкладку; рис. 2). Экспрессия MUC6 выявлялась лишь в средней трети и в донных отделах желез, достоверных различий в исследуемых группах не было выявлено.

В группе с кровотечением между двумя возрастными группами также оценивали продукцию желудочных муцинов в наружном крае язвенного дефекта. Показатель РЭ по MUC5AC в группе пожилых был достоверно ($p=0,027$) выше, чем в группе среднего возраста и достоверно не отличался ($p=0,289$) от аналогичного показателя группы без кровотечения (сопоставление с группой лиц среднего возраста). При иммуногистохимическом выявлении желудочных муцинов в 5 случаях в группе лиц 60-74 лет также обнаружено наличие отложений MUC5AC в зоне фибриноидного некроза дна хронической язвы, осложненной кровотечением (рис. 1, г, см. цв. вкладку).

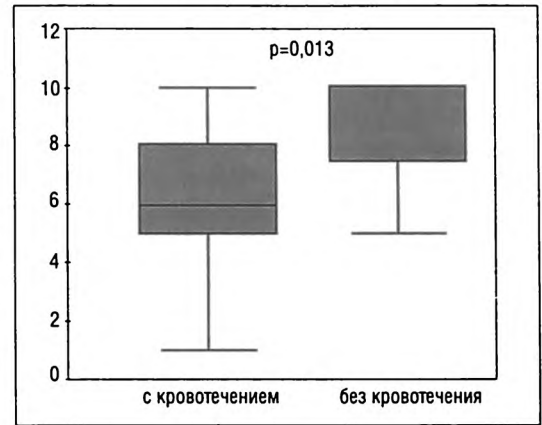
В 6 случаях язв с кровотечением и в 8 случаях язв без кровотечения в краях дефектов были обнаружены признаки полной и неполной кишечной метаплазии. В данных участках имелись отличия в экспрессии MUC5AC: при неполной кишечной метаплазии MUC5AC экспрессировался бокаловидными и цилиндрическими клетками в валиках, ямках и железах (рис. 1, б), при полной кишечной метаплазии экспрессия MUC5AC отсутствовала.

Оценка зрелости фибрина в дне хронических язв в исследуемых группах позволила установить, что в группе лиц с желудочным кровотечением возраста 30-59 лет в дне язвенных дефектов в 15 из 23 случаев преобладал «молодой» и «зрелый» фибрин (рис. 1, д, см. цв. вкладку), тогда как в группе без кровотечения в 5 из 8 наблюдений отмечали преобладание «старого» фибрина (рис. 1, е, см. цв. вкладку), однако достоверных различий между двумя группами не было выявлено ($p=0,328$). Также проведена оценка зрелости фибрина в дне хронических язв, осложненных кровотечением, между двумя возрастными группами: в обеих группах в дне язвенных дефектов преобладал «молодой» и «зрелый» фибрин, достоверных различий не обнаружено ($p=0,959$). Выявлялась сильная прямая корреляция ($k=0,760$; $p=0,048$) между степенью зрелости фибрина и диаметром язв в старшей возрастной группе, тогда как коэффициент корреляции между аналогичными параметрами в возрасте 30-59 лет составил $k=0,387$; $p=0,10$.

Обсуждение

При оценке продукции MUC5AC в исследуемых группах имелись достоверные разли-

Рисунок 2. Значения показателей распространенности экспрессии MUC5AC в СОЖ наружного края язвенного дефекта в группах с наличием и отсутствием кровотечения



чия при определении показателя РЭ в возрастной группе 30-59 лет, то есть в группе с кровотечением продукция протекторного муцина была выше, чем в группе без кровотечения. Язвенное кровотечение в данной возрастной группе, по всей вероятности, ассоциировано с продукцией муцина MUC5AC в краях язвенного дефекта, оценку которого можно использовать как один из факторов прогноза. При оценке продукции MUC5AC между двумя возрастными категориями в группе с кровотечением выявлены достоверные различия по показателю РЭ ($p=0,027$). У пожилых людей распространенность экспрессии в краях язвенных дефектов остается высокой. Можно полагать, что муцинпродуцирующая способность эпителия СОЖ в возникновении язвенного кровотечения у лиц пожилого возраста не играет ведущую роль. По всей вероятности, язвенное кровотечение у пожилых людей, в первую очередь, обусловлено другими причинами: сопутствующие заболевания, прием нестероидных противовоспалительных препаратов и др. [9, 11].

Наличие различий в продукции секреторного муцина MUC5AC в участках различных типов кишечной метаплазии представляется следующим образом: наличие неполной кишечной метаплазии в краях язвенного дефекта рассматривается как проявление фенотипа гастроинтестинальной репаративной линии [8, 9, 17, 21, 22, 24], основной задачей которой является обеспечение нормального синтеза MUC5AC. В норме данный муцин синтезируется только поверхностным эпителием, при неполной же кишечной метаплазии экспрессия представлена на всем протяжении, вплоть до донных отделов желез.

При оценке корреляционных связей можно сделать предположение, что у лиц пожилого возраста степень зрелости фибрина отражает динамику формирования дефекта: образование «старого» фибрина ассоциировано с увеличением диаметра язвы. Выявлялась сильная прямая корреляция ($k=0,760$; $p=0,048$) между степенью зрелости фибрина и диаметром язв в данной возрастной группе. Интересно, что такая корреляционная взаимосвязь отсутствует у лиц 30-59 лет, что, возможно, связано с низкой муцинпродуцирующей активностью эпителия края язвенного дефекта в данной группе. В группе с кровотечением в дне язвенных дефектов преобладает «молодой» и «зрелый» фибрин, который отражает альтерацию и сам факт кровотечения. «Старый» фибрин присутствует в основном в дне хронических язв, не осложненных кровотечением.

Существуют представления о так называемом «желатинозном мукоидном слое, связанном с фибрином» — своеобразном комплексе муцинов СОЖ, связанных с фибрином дна язв, который рассматривают как один из важнейших факторов защиты при уже сформированном дефекте [14, 15, 20, 23]. Сам факт существования такого слоя удалось подтвердить в 5 случаях в возрастной группе 60-74 лет нали-

чием MUC5AC в фибриноидном некрозе дна хронической язвы, а в группе лиц 30-59 лет данный муцин иммуногистохимически в дне язв не был выявлен. Это, вероятно, можно объяснить низким уровнем его продукции эпителиоцитами наружного края язвенного дефекта.

Играющий протекторную роль желудочный муцин MUC5AC у лиц 30-59 лет является одним из важных факторов морфогенеза осложнений хронической язвы, в частности кровотечения. Его детекция в эпителии края дефекта при биопсийном исследовании может быть предложена к использованию в качестве дополнительного маркера риска язвенного кровотечения. У лиц пожилого возраста продукция MUC5AC не ассоциирована с развитием кровотечения. Продукция желудочных муцинов MUC5AC и MUC6 не связана со степенью зрелости фибрина в дне язвенного дефекта в исследованных возрастных группах.

Обнаруженные корреляционные связи между размером язвы и зрелостью фибрина в возрастной группе 60-74 лет возможно отражают особенности морфогенеза и не определяют риск развития осложнений, присутствие «молодого» и «зрелого» фибрина в дне дефекта, вероятно, отражает сам факт присутствовавшего кровотечения.

Литература

1. Автандилов Г. Г. Основы количественной патологической анатомии. М., 2002.
2. Аруин, Л. И. Фибриноид и фибриноидный некроз в морфогенезе хронических язв желудка. Архив патологии. 1989; 12:16-23.
3. Аруин, Л. И., Капуллер Л. Л., Исаков В. А. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника. М: Трилада-Х, 1998.
4. Власов В. В. Эпидемиология: учебное пособие для вузов. М: Гэотар-Мед, 2004.
5. Гринхальх Т. Основы доказательной медицины. М: Гэотар-Мед, 2008.
6. Гуревич Л. Е., Казанцева И. А., Корсакова Н. А., Царьков П. В., Полищук Л.О. Особенности экспрессии муцинов 1-го и 2-го типов в эпителиальных опухолях толстой кишки. Архив патологии. 2007; 2:12-16.
7. Зербино Д. Д., Лукасевич Л. Л. Диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови. М., 1989.
8. Кононов А. В. Цитопротекция слизистой оболочки желудка: молекулярно-клеточные механизмы. Рос. журнал гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. 2006; 3:12-16.
9. Кононов А. В. Диагноз клинический и патологоанатомический в гастроэнтерологии: как избежать врачебных ошибок. Тюмень: Печатник, 2008.
10. Лапина, Т. Л. Возможности лекарственного воздействия на цитопротекторные свойства гастродуоденальной слизистой оболочки. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, проктологии. 2006; 5:75-80.
11. Михеева О. М. Язвенная болезнь у пожилых пациентов с артериальной гипертензией. Клиническая геронтология. 2008; 1:17-25.
12. Рук-во по Международной классиф. болезней, травм, причин смерти 10-го пересмотра. Женева: ВОЗ, 1985.
13. Силенченко Г. И., Селиванов Е. А., Мусинов И. М. Состояние системы гемостаза при язвенных желудочно-кишечных кровотечениях. Вестник хирургии. 2006; 2:15-30.
14. Allen A., Sellers L.A., Bennett M.K. The gastric mucosal epithelial barrier: role of mucus and fibrin. Scand. J. Gastroenterol. 1987; 128 (Suppl.): 6-13.
15. Allen A., Leonard A. J., Sellers L. A. The mucus barrier. Its role in gastroduodenal mucosal protection. J. Clin. Gastroenterol. 1988; 10(1):93-98.
16. Cahill R. J., Xia H., C. Kilgallen C. Effect of eradication of *Helicobacter pylori* infection on gastric epithelial cell proliferation. Dig. Dis. Sci. 1995; 40:1627-1631.
17. Longman R. J. Coordinated localization of mucins and trefoil peptides in the ulcer associated cell lineage and the gastrointestinal mucosa. Gut. 2000; 47:792-800.
18. Rosai J. Ackerman's surgical pathology. 8nd ed. Mosby-Year Book, 1995.
19. Satoh K., Kawata H., Tokumaru K. Change in apoptosis in the gastric surface epithelium and glands after eradication of *Helicobacter pylori*. Dig. Liver. Dis. 2003; 35(2):78-84.
20. Sellers L. A., Allen A., Bennett M. K. Formation of a fibrin based gelatinous coat over repairing rat gastric epithelium after acute ethanol damage: interaction with adherent mucus. Gut. 1987; 28:835-843.
21. Tarnawski A., Halter F. Cellular mechanisms, interactions, and dynamics of gastric ulcer healing. J. Clin. Gastroenterol. 1995; 21(1):93-97.
22. Tarnawski A. Cellular and molecular events in the ulcer margin. Digestive Diseases and Sciences. 2005; 50:23-35.
23. Wallace J. L., Whittle B. J. The role of extracellular mucus as a protective cap over gastric mucosal damage. Scand. J. Gastroenterol. 1986; 125 (Suppl.):9-85.
24. Wright N. A. Trefoil peptide gene expression in gastrointestinal epithelial cells in inflammatory bowel disease. Gastroenterology. 1993; 104:12-20.
25. Yang Y., Deng C. S., Peng J. Z. Effect of *Helicobacter pylori* on apoptosis and apoptosis related genes in gastric cancer cells. Mol. Pathol. 2003; 56(1):19-24.

Рисунок 1. Экспонирование меток рецепторов факторов роста, матричных металлопротеиназ, их тканевого ингибитора эпителиоцитами и компонентами стромы слизистой оболочки желудка при *H.pylori*-ассоциированном хроническом гастрите:

- а) Интенсивное диффузное распределение EGFR в мембранах и цитоплазме glandулоцитов желудочных желез;
 б) Неравномерное распределение TGFR- \square в цитоплазме и ядрах эпителия желез;
 в) умеренное диффузное экспонирование метки MMP-2 glandулоцитами, клетками воспалительного инфильтрата и внеклеточным матриксом (антральный отдел);
 г) интенсивное экспонирование метки MMP-9 базальной мембраной, glandулоцитами, клетками воспалительного инфильтрата и внеклеточным матриксом антрального отдела;
 д) Интенсивное селективное распределение TIMP-1 в мембранах и цитоплазме glandулоцитов и диффузное в строме (фундальный отдел);
 е) Интенсивное селективное распределение TIMP-1 под эпителием валика, в glandулоцитах, клетках воспалительного инфильтрата и интенсивное диффузное распределение во внеклеточном матриксе (фундальный отдел).
 Стрептавидин-биотиновый метод с докраской ядер гематоксилином, система детекции, хромоген — диаминобензидин. а, б, г, е — $\times 400$; в, д — $\times 200$.

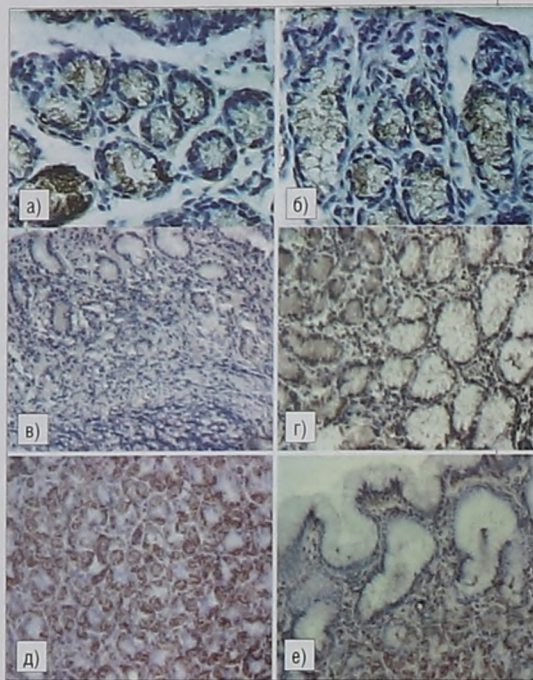


Рисунок к статье Э. В. Яковлевой, С. И. Мозгового и А. В. Кононова

«Роль протективных факторов слизистой оболочки желудка в морфогенезе хронических язв, осложненных кровотечением», стр. 31.

Рисунок 1. Особенности экспрессии MUC5AC в крае дефекта и оценка зрелости фибрина дна язв, осложненных и не осложненных кровотечением:

- а) Высокий уровень экспрессии MUC5AC в биоптате края хронической язвы, не осложненной кровотечением;
 б) Экспрессия MUC5AC в бокаловидных и цилиндрических клетках участка неполной кишечной метаплазии в крае язвы, осложненной кровотечением;
 в) Низкий уровень экспрессии MUC5AC в крае хронической язвы, осложненной кровотечением;
 г) Отложения MUC5AC в зоне фибриноидного некроза хронической язвы, осложненной кровотечением;
 д) Преобладание «зрелого» фибрина (красный цвет) в дне язвы, осложненной кровотечением;
 е) Преобладание «старого» фибрина (синий цвет) в дне язвы, не осложненной кровотечением.
 а, б — $\times 100$, в-е — $\times 200$.

