

Клинико-лабораторная оценка динамики активности воспалительного процесса у детей при хронических гастритах

ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России, кафедра госпитальной педиатрии и неонатологии

Научный руководитель: д.м.н. Трифонов В.Д.

Резюме

Цель: оценить динамику активности воспалительного процесса по данным клинического и лабораторного анализа. Материалы и методы: обследовали 90 детей с хроническим гастродуоденитом. Изучили жалобы, локализацию пальпаторной болезненности живота; концентрацию ФНО- α и ИЛ-2 в сыворотке крови. Морфологически оценили состояние покровного эпителия, эпителия желез, стромы собственно слизистой оболочки желудка; процессы апоптоза и пролиферации. В анамнезе через 3 месяца обследовали 13 детей. Результаты: Большинство детей предъявляли жалобы на боли в животе, реже на отрыжку и изжогу. Пальпаторно живот был болезненным. Уровни ФНО- α и ИЛ-2 были повышены. Морфологически отметили уплощение покровного эпителия, участки его десквамации. Уплотнился эпителий желез, регистрировали его дистрофию, менялся контур апикального края эпителиоцитов. В строме собственно слизистой оболочки желудка (СОЖ) выявили клеточную инфильтрацию смешанного характера; слабую или умеренную активность гастрита. Пролиферация преобладала над апоптозом. Через 3 месяца отмечали болевой абдоминальный синдром, повышенные значения цитокинов; морфологические изменения СОЖ; менялось соотношение пролиферации и апоптоза в сторону усиления апоптоза. Заключение: выявленные клинические, морфологические, лабораторные изменения предлагается применять для оценки эффективности лечения.

Ключевые слова: гастродуоденит, активность, дети, цитокины, морфология

Актуальность

В Саратовской области по данным Материалов Государственного доклада «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2013 году» в структуре первичной заболеваемости детей и подростков патология органов пищеварения заняла четвертое место, что делает актуальным её изучение [5].

Цель работы и задачи исследования: оценить динамику активности воспалительного процесса по данным клинического и лабораторного анализа.

Материал и методы

В стационаре обследовали 90 детей в период обострения хронического гастродуоденита (ХГД). Из них 53,3% (48) мальчиков и 46,7% (42) девочек. Средний возраст обследованных – $10,9 \pm 0,3$ года.

Детей обследовали по единому плану. При поступлении в стационар все пациенты заполняли анкету, содержащую сведения о наличии диспепсии (отрыжки и изжоги), болевого абдоминального синдрома. Интенсивность боли оценивали по бальной шкале от 0 до 3, где 0 – отсутствие боли, 1 – слабая боль, 2 – умеренная, 3 – выраженная.

Путем объективного обследования выявили локализацию пальпаторной болезненности живота.

Диагноз подтвердили эндоскопически. По показаниям провели рентгеноскопию желудка и двенадцатиперстной кишки. Во время эндоскопического исследования из наиболее измененного участка антрального отдела желудка забирали фрагмент и мазок-отпечаток со слизистой для дальнейшего морфологического исследования. Гастробиоптаты ($n=34$) фиксировали в 10% забуференном формалине с дальнейшей заливкой в гомогенизованную парафиновую среду HISTOMIX (БиоВитрум, Россия). На ротационном микротоме приготавливали срезы толщиной 5-7 мкм. После депарафинизации срезы окрашивали гематоксилин-эозином по общепринятой методике для дальнейшего обзорного морфологического исследования.

Морфологически в гастробиоптатах оценили состояние покровного, железистого эпителия и стромы собственно слизистой желудка. Активность гастрита анализировали по визуально-аналоговой шкале [2].

Срезы импрегнировали серебром по методу Мозера (1995) с последующей детекцией апоптотических ядер [10]. Индекс апоптоза (ИА,%) рассчитывали как соотношение числа апоптотических ядер (окрашенных по методу Мозера) к общему числу ядер, умноженное на 100 [7].

Стандартным методом с использованием моноклональных мышиных антител провели иммуногистохимическое окрашивание срезов [9]. Изучили экспрессию проапоптотического белка Bax (Bcl-2-associated X protein) и маркера пролиферации PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), применяя детекционную систему EnVision («Dako», Дания), в качестве хромогена – диаминобензидин.

Оценку экспрессии изучаемых белков осуществляли с применением метода Histochemical score (Hscore). Учитывали количество иммунопозитивных клеток и сумму произведений процентов, отражающих долю клеток с различной интенсивностью окраски на балл, соответствующий интенсивности реакции [9].

Индекс пролиферации (ИП) определяли по формуле: $\text{ИП (PCNA)\%} = N (\text{кол-во ядер, иммунопозитивных к PCNA})/N (\text{общее количество ядер}) * 100$ [8].

Верификацию *Helicobacter pylori* (HP) осуществляли цитологически (n=51), гистологически (n=34) и серологически с определением антихеликобактерных антител класса Ig G (n=82).

У всех обследуемых в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа («Вектор Бест», г. Новосибирск) проанализировали цитокиновый профиль (концентрацию ФНО- α и ИЛ-2). Непосредственно перед постановкой реакции все образцы сывороток при комнатной температуре размораживали и перемешивали.

Все исследования, кроме эндоскопического и морфологического, осуществляли дважды: при поступлении в стационар и спустя 10-11 дней лечения.

В стационаре пациенты получали терапию ингибиторами протонной помпы, антацидами, физиотерапевтическое лечение, по показаниям – эрадикационную терапию (n=27).

Для анализа полученных данных применяли статистический пакет SPSS (версия 17.0). Определение статистической значимости результатов проводили с применением непараметрических критериев. Парные зависимые показатели изучали критерием Уилкоксона [3;6].

Результаты

97,8% (88) детей из 90 обследованы в стационаре с жалобами на боли в животе. У 23,3% (21) боль носила слабую интенсивность, у 63,3% (57) – умеренную, у 11,1% (10) – выраженную. Двое детей были госпитализированы без болевого синдрома с явлениями диспепсии. После лечения жалобы на слабовыраженные боли в животе сохранялись у 5,6% (5) пациентов.

При поступлении в стационар живот пальпаторно был болезненным в эпигастральной области – у 90% (81) детей, в пилородуоденальной – у 51,1% (46), безболезненный – у 3,3% (3).

Спустя 10-11 дней лечения пальпаторная болезненность живота сохранялась в 26,7% (24) случаев: в эпигастрии у 25,6% (23) ($p < 0,001$), в пилородуоденальной зоне – у 8,9% (8) ($p < 0,001$).

Среди явлений диспепсии преобладала отрыжка (55,6%), реже изжога (40%). После лечения отрыжка сохранялась только у одного ребенка.

Сопутствующая патология органов пищеварения представлена гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью (14,4%), дуоденогастральным рефлюксом (24,4%), аномалией желчного пузыря (50%), дискинезией желчевыводящих путей (80%).

Цитокиновый профиль на момент госпитализации характеризовался повышением уровня ФНО- α и ИЛ-2 в сыворотке крови до $80,36 \pm 11,67$ пг/мл и $49,34 \pm 7,45$ пг/мл соответственно. Референтные значения для ФНО- α – 0-6 пг/мл, для ИЛ-2 – 0-10 пг/мл.

После лечения концентрация обоих цитокинов снижалась, но не достигала референтных значений. ФНО- α составил $49,15 \pm 8,55$ пг/мл ($p = 0,001$), ИЛ-2 – $25,66 \pm 4,48$ пг/мл ($p = 0,001$).

У детей с инфекцией HP уровень цитокинов был выше в сравнении с неинфицированными пациентами.

Морфологическое исследование гастробиоптатов (n=34) выявило изменения со стороны покровного, железистого эпителия и стромы собственно слизистой оболочки желудка.

Изменения покровного эпителия характеризовались его уплощением до $16,3 \pm 1,2$ мкм (при норме около 30 мкм [1]) и наличием участков десквамации (55,9%).

Высота эпителия желез составила $23,9 \pm 1,1$ мкм при норме $25,9 \pm 1,3$ мкм в антральном отделе [4]. Дистрофические изменения эпителия желез выявили в 85,3% (29) случаев. Неровный контур апикального края эпителиоцитов – у 58,8% (20).

В строме собственно слизистой оболочки желудка у всех детей определяли наличие клеточной инфильтрации слабой (47,1%) или умеренной (52,9%).

Инфильтрация носила смешанный характер. Состав инфильтрата: лимфоциты ($69,0 \pm 8,7$ в поле зрения), плазмоциты ($24,3 \pm 5,2$ в поле зрения), нейтрофилы ($3,2 \pm 0,3$ в поле зрения), базофилы ($0,4 \pm 0,2$ в поле зрения).

У 82,4% (28) детей наблюдали отек стромы: слабый (53%), умеренный (17,6%), выраженный (11,8%). Фиброз фиксировали у 44,1% (15): слабый – 29,4% (10), умеренный – 14,7% (5).

По данным визуально-аналоговой шкалы у детей с обострением ХГД регистрировали слабую активность гастрита – 76,5% (26), умеренную – 23,5% (8).

Иммуногистохимически слабopоложительную экспрессию Вах регистрировали у 16 детей в покровном эпителии и у 4 детей в эпителии желез. В остальных наблюдениях экспрессия была положительной.

Слабopоложительную экспрессию PCNA выявили у 9 детей в покровном эпителии и у одного ребенка в эпителии желез. В остальных случаях выявили положительную экспрессию маркера пролиферации.

Пролиферация преобладала над апоптозом (по ИА и ИП). ИА в покровном эпителии был равен $12,7 \pm 1,1\%$, в эпителии желез – $11,9 \pm 1\%$. ИП составил $79,4 \pm 1,8\%$ и $83,6 \pm 1,6\%$ соответственно.

У инфицированных HP детей ИА и ИП в покровном эпителии несколько выше, чем у неинфицированных.

Из 90 детей 13 пациентов обследовали в катамнезе через 3 месяца. Эндоскопически у всех детей во время повторного обследования отмечали активность воспалительного процесса разной степени выраженности.

У этих 13 детей динамику клинических, морфологических изменений проследили с момента их первой госпитализации.

Так, в первую госпитализацию все 13 детей предъявляли жалобы на боли в животе: слабой интенсивности – 30,8% (4) и умеренной – 69,2% (9). После лечения жалоб на боли в животе не было ($p < 0,001$).

При обследовании через 3 месяца у 30,8% (4) пациентов возобновлялись боли в животе ($p=0,046$) преимущественно слабой интенсивности (23,1%). После лечения болевой синдром был купирован ($p=0,046$).

В первую госпитализацию при поступлении пальпаторную болезненность живота в эпигастрии фиксировали у 92,3% (12), в пилородуоденальной области – у 76,9% (10).

После лечения пальпаторная болезненность живота сохранялась у 30,8% (4) детей: в эпигастральной области – у 23,1% (3) ($p=0,007$), в пилородуоденальной – у 23,1% (3) ($p=0,02$).

При обследовании в катamnезе через 3 месяца пальпаторную болезненность живота отмечали у большинства детей (92,3%): в эпигастрии – 69,2% (9), пилородуоденальной зоне – 46,2% (6). После лечения у всех детей живот был безболезненным ($p=0,001$).

В первую госпитализацию жалобы на отрыжку регистрировали у 53,8% (7) детей, изжогу – 61,5% (8), которые купировались на фоне лечения и к 3 месяцу наблюдения не возобновлялись.

Динамика ФНО- α была следующей: в первую госпитализацию на момент поступления – $157,18 \pm 32,24$ пг/мл, спустя 10-11 дней лечения – $92,04 \pm 27,22$ пг/мл ($p=0,033$), через 3 месяца на момент поступления – $51,27 \pm 15,99$ пг/мл, через 10-11 дней терапии – $2,74 \pm 1,28$ пг/мл ($p=0,005$).

Динамика ИЛ-2: в первую госпитализацию при поступлении $109,70 \pm 29,64$ пг/мл, спустя 10-11 дней лечения – $54,30 \pm 15,52$ пг/мл ($p=0,034$), через 3 месяца при поступлении – $27,17 \pm 9,93$ пг/мл, через 10-11 дней терапии – $1,57 \pm 0,82$ пг/мл ($p=0,028$).

Сходный характер изменений отмечали у детей после проведенной в первую госпитализацию эрадикации ($n=7$).

Динамику морфологических изменений со стороны эпителия желез и стромы собственно слизистой оболочки желудка оценили у 7 детей из 13.

Изменения покровного эпителия характеризовались его уплощением в обе госпитализации. Число случаев десквамации снизилось с 85,7% (6) до 57,1% (4).

Со стороны эпителия желез также наблюдалось его уплощение в обе госпитализации.

В первую госпитализацию наличие дистрофии выявили во всех случаях, при обследовании через 3 месяца – в 71,4% (5). При первом обследовании неровный контур апикального края эпителиоцитов определили у 71,4% (5) детей, спустя 3 месяца – у одного ребенка ($p=0,046$).

В первую госпитализацию клеточная инфильтрация была слабой в 57,1% (4) случаев, умеренной – в 42,9% (3). Через 3 месяца слабая инфильтрация сохранялась у 85,7% (6) пациентов, умеренная – у одного ребенка.

В обе госпитализации инфильтрация была смешанной. В первую госпитализацию клеточный инфильтрат представлен: лимфоцитами ($86,5 \pm 14,56$ в поле зрения), плазмócитами ($22,6 \pm 10,6$ в поле зрения), нейтрофилами ($4,4 \pm 0,6$ в поле зрения), базофилами ($0,4 \pm 0,2$ в поле зрения). Спустя 3 месяца количество лимфоцитов снизилось в 2,7 раза до $31,6 \pm 4,0$ в поле зрения ($p=0,028$). Количество плазмócитов не изменилось, составив $20,0 \pm 6,5$ в поле зрения. Число нейтрофилов было равно $2,9 \pm 0,3$ в поле зрения. Базофилы выявить не удалось.

В обе госпитализации у 85,7% (6) пациентов отмечали признаки фиброза.

Слабый фиброз выявили в 57,1% (4) случаев, умеренный – в 28,6% (2). В катamnезе данное соотношение не менялось.

Отек стромы также определили в обе госпитализации. При первом обследовании слабовыраженный отек фиксировали в 85,7% (6) случаев, умеренный – у одного ребенка. При обследовании через 3 месяца слабый отек обнаруживали у 71,4% (5) детей, умеренный – у 28,6% (2).

По данным визуально-аналоговой шкалы слабую активность гастрита отметили у 57,1% (4) детей, умеренную – у 42,9% (3). При обследовании через 3 месяца у всех детей обнаружили слабую активность гастрита.

По результату иммуногистохимического исследования к 3 месяцу наблюдения экспрессия PCNA во всех случаях была положительной. А изменение экспрессии Вах носило разнонаправленный характер.

Соотношение пролиферации и апоптоза менялось в сторону усиления апоптоза и замедления пролиферации преимущественно в покровном эпителии (ИА $-20,6 \pm 2,2$ %/ ИП $-70,4 \pm 9,5$ %).

Заключение

Проведенное динамическое обследование детей с хроническим гастродуоденитом позволило структурировать клинические и лабораторные критерии активности воспалительного процесса.

Клиническими критериями стали: наличие абдоминального болевого синдрома, явлений диспепсии, пальпаторная болезненность живота преимущественно в эпигастрии и пилородуоденальной области. Морфологическими: уплощение и десквамация покровного эпителия, уплощение эпителиоцитов желез и неровный контур их апикального края, дистрофия железистого эпителия, лимфоплазмócитарная инфильтрация, отек и наличие фиброза, экспрессия Вах и PCNA, показатели ИА и ИП. Лабораторными: уровень ФНО- α и ИЛ-2 в сыворотке крови, поскольку в нашей работе высокие их значения были характерны для активного воспалительного процесса.

Выявленные клинико-морфологические критерии активности гастрита могут быть применены для оценки эффективности лечения.

Литература

1. Аруин Л.И., Григорьев П.Я., Исаков В.А., Яковенко Э.П. Хронический гастрит. – Амстердам, 1993. – 362 с.
2. Аруин Л.И., Капуллер Л.Л., Исаков В.А. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника. – М.: Триада-Х, 1998. – 496 с.

3. Бююль А., Цефель П. SPSS: искусство обработки информации. Анализ статистических данных и восстановление скрытых закономерностей. – Киев: ДиаСофт, 2005. – 608с.
4. Леонтьева Н.И. Клинико-патогенетические аспекты хеликобактериоза, диагностика и тактика лечения. Автореф. ...докт. мед. наук. Москва. – 2012. – 53с.
5. Материалы Государственного доклада «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2013 году» по Саратовской области-2014г. - С.257. URL:http://64.rospotrebnadzor.ru/search?p_p_id=3&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-&p_p_col_count=2&_3_struts_action=%2Fsearch%2Fsearch (дата обращения 18.01.2015).
6. Наследов А. SPSS 19: профессиональный статистический анализ данных. – СПб: Питер, 2011. – 400 с.
7. Сущенко М.А., Козлова И.В. Клинико-диагностическое значение показателей апоптоза и пролиферации эзофагогастродуоденальной зоны при алкогольной болезни печени// Саратовский научно-медицинский журнал.– 2009. – Т. 5, № 3.– С. 347–352.
8. Тищенко Д.В., Матвеева О.В., Черненко Ю.В., Маслякова Г.Н., Бучарская А.Б.. Клинико-морфологическое исследование хронического дуоденита у детей//Саратовский научно-медицинский журнал. – 2012. – Т. 8, № 3. – С. 799–803.
9. Эллиниди В.Н., Анисеева Н.В., Максимова Н.А. Практическая иммуногистохимия (методические рекомендации) – СПб., 2002– 36 с.
10. Moser B.A. Silver stain for the detection of apoptosis at the light microscope//Microscopy Analysis. – 1995. – Vol. 37. – P. 27–29.