

УДК: 616.348-002-036.12] –076.312

## НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ В ДИАГНОСТИКЕ ЯЗВЕННОГО КОЛИТА

Маркова А. А., Кашкина Е. И., Маслякова Г. Н.

ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского Минздрава России

## NEW OPPORTUNITIES IN THE DIAGNOSIS OF ULCERATIVE COLITIS

Markova A. A., Kashkina E. I., Maslyakova G. N.

State Budget Educational Institution of High Vocational Education «Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky» of the Ministry of Public Health of Russia.

*Маркова Анна Александровна* — ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского Минздрава России, аспирант кафедры госпитальной терапии лечебного факультета;

*Кашкина Елена Игоревна* — ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского Минздрава России, д.м.н., профессор кафедры госпитальной терапии лечебного факультета;

*Маслякова Галина Никифоровна* — ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского Минздрава России, д.м.н., профессор, заведующая кафедрой патологической анатомии.

*Markova A. A.* — Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky, Post-graduate student of the Chair of Hospital Therapy, Faculty of Medicine;

*Kashkina E. I.* — Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky, Doctor of Medicine, Professor of the Chair of Hospital Therapy, Faculty of Medicine;

*Maslyakova G. N.* — Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky, Doctor of Medicine, Professor, Head of the Chair of Morbid Anatomy.

Маркова  
Анна Александровна.  
Markova Anna A.  
E-mail:  
markova-ann@yandex.ru

## Резюме

**Цель исследования:** провести анализ экспрессии маркеров апоптоза и пролиферации у больных язвенным колитом.

**Материалы и методы:** у 80 пациентов с язвенным колитом был проведен анализ экспрессии маркера апоптоза BAX и маркера пролиферации Ki-67, а также регулятора клеточного цикла p53 в биоптатах слизистой оболочки толстой кишки.

**Результаты:** отмечено снижение пролиферативной активности клеток и увеличение показателя апоптоза в зависимости от продолжительности и тяжести течения, локализации воспалительного процесса и его эндоскопической активности.

**Ключевые слова:** язвенный колит, маркеры апоптоза и пролиферации.

Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология 2015; 114 (2):35–39

## Summary

**Purpose of the study:** to analyze the expression of markers of apoptosis and proliferation in patients with ulcerative colitis.

**Materials and methods:** in 80 patients with ulcerative colitis the analysis of expression of apoptosis marker BAX and proliferation marker Ki-67, as well as the cell cycle regulator p53 in biopsy materials of the mucous membrane of the colon was carried out.

**The results:** decreased cell proliferative activity and increase of the apoptosis rate depending on the severity, the localization of the inflammatory process and its endoscopic activity were registered.

**Keywords:** ulcerative colitis, markers of apoptosis and proliferation.

Ekspierimental'naya i Klinicheskaya Gastroenterologiya 2014; 114 (2):35–39

## Введение

В последние десятилетия во всем мире наблюдается значительный рост распространенности язвенного колита (ЯК) [1,2,3,4]. Это заболевание характеризуется хроническим рецидивирующим воспалением слизистой оболочки толстой кишки [5,6,7]. Особую актуальность приобретает эта проблема в связи с преимущественным поражением лиц молодого трудоспособного возраста, нередко тяжелым течением патологического процесса и развитием опасных для жизни осложнений [8,9,10].

Для диагностики ЯК используются клиническое и лабораторное обследование, рентгенологический, эндоскопический и гистологический методы исследования. В последние годы одним из перспективных способов оценки состояния слизистой оболочки толстой кишки является иммуногистохимическое исследование с определением маркеров пролиферации и апоптоза. С этой целью наиболее часто используются PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) и Ki-67. Антигеном, достоверно ассоциированным с фазами клеточного цикла, является Ki-67, так как его экспрессия дает возможность идентифицировать клетки, находящиеся во всех фазах клеточного цикла, кроме фазы покоя G0 [11,12]. PCNA, как известно, участвует в репарации ДНК после ее повреждения, которое

осуществляется в фазе покоя [13], поэтому PCNA можно отнести к маркерам, условно специфичным к клеточному циклу [14,15]. К наиболее изученным регуляторам апоптоза относится белок p53 и семейство bcl. Белок p53 локализуется в ядре клеток, он нестабилен, но при повреждении ДНК он становится стабильным, и его концентрация в ядре повышается. Выделяют два типа белка p53 — мутантный и «дикий». «Дикий» образуется в норме, но так как он имеет короткий период полужизни, методами иммуногистохимии в тканях не определяется. Мутантный белок способен полностью инактивировать «дикий», что приводит к стимуляции опухолевого роста. Гены семейства bcl2 также регулируют процесс апоптоза. Экспрессией генов этого семейства, расположенных на внутриклеточных мембранах [16], управляет ген p53. Кроме того, накопление p53 в ядре клетки инициирует процесс апоптоза при отсутствии повреждения ДНК [17,18].

**Цель исследования:** провести анализ экспрессии маркеров апоптоза (BAX), пролиферации (Ki-67) и регулятора клеточного цикла (p53) у больных ЯК в зависимости от длительности заболевания, степени тяжести, локализации и эндоскопической активности воспалительного процесса.

## Материал и методы исследования

Обследование пациентов проводилось с использованием клинических, эндоскопических, лабораторных, морфологических методов. Пациенты с ЯК были разделены на группы в зависимости от длительности заболевания, степени тяжести клинических проявлений, локализации и активности воспалительного процесса.

Имуногистохимические реакции проводили на серийных парафиновых срезах биоптатов толстой кишки, используя стрептавидин-биотиновый метод.

При изучении маркеров пролиферации Ki-67 и апоптоза BAX основную группу составили 80 пациентов с верифицированным ЯК в возрасте от 18 до 66 лет (33 женщины и 47 мужчин). Индекс пролиферации Ki-67 (%) вычисляли путем подсчета количества иммунопозитивных ядер к общему количеству ядер. Подсчет производился не менее чем в 10 полях зрения.

При анализе BAX подсчитывали процент иммунопозитивных клеток с различной степенью экспрессии (слабая, умеренная, выраженная), которая определялась полуколичественным методом.

Для оценки экспрессии белка p53 в основную группу вошли 48 пациентов с ЯК в возрасте от 20 до 66 лет (24 женщины и 24 мужчины). В клетках поверхностного эпителия толстой кишки и в эпителии желез слизистой определялась интенсивность экспрессии белка (слабая, умеренная и выраженная) и % экспрессирующих клеток в эпителии желез.

Группу сравнения составили 15 практически здоровых людей.

Полученные данные были статистически обработаны. Для сравнения групп применялись непараметрические критерии. Для описания количественных признаков использовались медиана, верхний и нижний квартили. Для сравнения 2-х групп по качественному признаку применялся тест Манна-Уитни.

## Результаты исследования и их обсуждение

У здоровых лиц ИП Ki-67 составил 54 (46;67). Это свидетельствует о высокой пролиферативной активности клеток толстой кишки (табл. 1).

Как следует из таблицы 1, повышение ИП Ki-67 в группе с длительностью заболевания от 1 года до 5 лет по сравнению с группой больных ЯК до года, можно объяснить повышенной пролиферативной активностью клеток, отражающей репаративные процессы в слизистой оболочке толстой кишки. Низкий ИП Ki-67 в группе пациентов с ЯК длительностью до года может свидетельствовать о выраженном снижении пролиферативных

процессов в слизистой оболочке кишки в дебюте заболевания.

ИП Ki-67 уменьшался у больных со средне-тяжелой формой заболевания и тяжелой формой по сравнению с пациентами с легким течением болезни. Имелось также различие между группой здоровых лиц и пациентами с ЯК любой степени тяжести.

При анализе зависимости ИП Ki-67 от локализации воспалительного процесса было выявлено значительное повышение экспрессии маркера в группе больных ЯК по сравнению со здоровыми

Анализируемые группы	n	ИП Ki-67	Достоверность различий
Группа сравнения	15	54(46;67)	
Длительность заболевания			
< 1 года	21	32(28;37)	$p_0 \leq 0,0002$
1-5 лет	33	39(31;45)	$p_0 \leq 0,0005$ $p_1 \leq 0,06$
> 5 лет	26	35(22;47)	$p_0 \leq 0,0003$ $p_1 \geq 0,05$
Тяжесть течения:			
- легкая	21	45(37;47)	$p_0 \leq 0,01$
- средне-тяжелая	47	34(30;40)	$p_0 \leq 0,00001$ $p_2 \leq 0,0006$
- тяжелая	12	30(28;31)	$p_0 \leq 0,002$ $p_2 \leq 0,002$
Локализация ЯК			
- дистальный	26	45(37;46)	$p_0 \leq 0,007$
- левосторонний	39	35(31;40)	$p_0 \leq 0,00003$ $p_3 \leq 0,01$
- тотальный	15	30(28;31)	$p_0 \leq 0,0002$ $p_3 \leq 0,0009$
Эндоскопическая активность			
I	28	44(36-46)	$p_0 \leq 0,004$
II	35	32(28-40)	$p_0 \leq 0,00001$ $p_4 \leq 0,002$
III	17	34(31-35)	$p_1 \leq 0,002$ $p_4 \leq 0,02$

**Таблица 1.**  
Индекс пролиферации Ki-67 клеток эпителия слизистой оболочки толстой кишки (%) у больных ЯК и здоровых людей

**Примечание:**  
 $P_0$  — достоверность различий с группой контроля  
 $P_1$  — достоверность различий с длительностью заболевания до 1 года  
 $P_2$  — достоверность различий с легким течением заболевания  
 $P_3$  — достоверность различий с дистальной локализацией заболевания  
 $P_4$  — достоверность различий с I степенью эндоскопической активности.

людьми, кроме того, отмечалось снижение ИП при увеличении площади поражения толстой кишки.

Из таблицы 1 видно, что при увеличении активности заболевания ИП Ki-67 снижается. Имеются достоверные различия между группой пациентов с активностью I степени и группами пациентов со II и III степенями активности.

У всех пациентов с ЯК ИП Ki-67 был значительно ниже, чем в группе сравнения, где он составил 54. Ki-67 является отражением активности репаративных процессов, т.о. можно предположить, что наименьшая репаративная активность наблюдается в дебюте заболевания, когда в процессе воспаления преобладают деструктивные и экссудативные проявления, а также при длительности заболевания более 5 лет, что, видимо, обусловлено истощением компенсаторных механизмов. Незначительно снижается при легком течении ЯК, индекс пролиферации практически в два раза уменьшается при тяжелом течении, что неблагоприятно для протекания репаративных процессов в слизистой оболочке. Так же можно отметить: чем больше площадь поражения кишки, тем меньше ИП Ki-67. Эндоскопическая активность, отражающая в основном активность воспалительного процесса и прежде всего экссудативного компонента, также имеет прямую связь с изменением ИП Ki-67. Чем выше эндоскопическая активность, тем менее выражен ИП Ki-67.

Экспрессия VAX определялась как в поверхностном, так и в железистом эпителии толстой кишки. Было установлено, что экспрессия данного маркера в поверхностном эпителии и в эпителии желез практически одинакова в каждом отдельном случае. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Экспрессия VAX у здоровых лиц отсутствовала в 80 % случаев, а в 20 % отмечалась низкая интенсивность экспрессии маркера. В основной группе больных с ЯК количество экспрессирующих клеток и интенсивность экспрессии были различными.

При анализе экспрессии VAX у пациентов с ЯК в группе больных с продолжительностью заболевания менее одного года не было выявлено ни одного случая с отрицательной экспрессией, причем

преобладала умеренно выраженная ее интенсивность, что может свидетельствовать о нарастании апоптотической активности клеток в дебюте заболевания. У больных в группе с длительностью заболевания от 1 года до 5 лет в одной трети случаев наблюдалась отрицательная экспрессия, что, видимо, обусловлено становлением компенсаторно-приспособительных процессов. При продолжительности ЯК более пяти лет отрицательная экспрессия VAX наблюдалась только в 9 % случаев, что обусловлено, по всей видимости, начинающимися процессами декомпенсации. Следует отметить, что у 18,1 % больных отмечалась выраженная экспрессия маркера, которая отсутствовала как в группе сравнения, так и в двух других группах пациентов с продолжительностью ЯК менее 5 лет. Значимые различия в экспрессии маркера были выявлены между группой сравнения и больными ЯК независимо от длительности заболевания ( $p \leq 0,01$ ).

Были отмечены изменения экспрессии VAX в зависимости от степени тяжести клинических проявлений ЯК. При легкой и средне — тяжелой форме количество случаев с отрицательной экспрессией составило 22 % и 10 % соответственно. При тяжелом течении ЯК VAX экспрессировал у всех больных. Установлены достоверные различия в экспрессии маркеров между группой сравнения и пациентами с ЯК независимо от тяжести клинических проявлений ( $p \leq 0,01$ ). При анализе экспрессии маркера в зависимости от локализации процесса в 100 % случаев VAX экспрессировал у больных с тотальным колитом ( $p \leq 0,03$ ) по сравнению с дистальным колитом, при этом выраженность экспрессии в этой группе также была максимальной.

Анализ экспрессии маркера в зависимости от эндоскопической активности показал, что при ее III степени наблюдается 100 % экспрессия маркера, хотя и слабой интенсивности. Достоверных различий между группами с различной эндоскопической активностью не получено.

Экспрессия r53 в эпителии слизистой оболочки толстой кишки у практически здоровых людей не наблюдалась ни в одном случае.

**Таблица 2.**

Экспрессия ВАХ в поверхностном и железистом эпителии толстой кишки у практически здоровых людей и больных ЯК.

Экспрессия	Группа сравнения					
	п		%			
Слабая	3		20			
Умеренная	-		-			
Выраженная	-		-			
Отриц.	12		80			
Длительность заболевания ЯК						
	До 1 года		От 1 до 5 лет		Более 5 лет	
	п	%	п	%	п	%
Слабая	4	15,3	10	55,6	10	45,5
Умеренная	22	84,7	2	11,1	6	27,3
Выраженная	-	-	-	-	4	18,1
Отриц.	-	-	6	33,3	2	9,1
Тяжесть течения						
	Легкая		Средняя		Тяжелая	
	п	%	п	%	п	%
Слабая	12	66,7	26	65	4	50
Умеренная	-	-	8	20	4	50
Выраженная	2	11,1	2	5	-	-
Отриц.	4	22,2	4	10	-	-
Локализация ЯК						
	Дистальный		Левосторонний		Тотальный	
	п	%	п	%	п	%
Слабая	16	66,6	20	66,6	6	50
Умеренная	2	8,4	6	20	4	33,3
Выражен.	-	-	2	6,7	2	16,7
Отриц.	6	25	2	6,7	-	-
Эндоскопическая активность						
	I		II		III	
	п	%	п	%	п	%
Слабая	16	61,6	18	56,2	8	100
Умеренная	2	7,7	10	31,2	-	-
Выражен.	2	7,7	2	6,3	-	-
Отриц.	6	23,0	2	6,3	-	-

**Таблица 3.**

Экспрессия белка p53 у больных ЯК.

Положительная экспрессия	Длительность заболевания		
	До 1 года % (абс.)	От 1 года до 5 лет % (абс.)	Более 5 лет % (абс.)
	33,3(6)	12,5(2)	42,8(6)
Положительная экспрессия	Тяжесть заболевания		
	Легкая % (абс.)	Средняя % (абс.)	Тяжелая % (абс.)
	12,5 (2)	35,7 (10)	50 (2)
Положительная экспрессия	Локализация ЯК		
	Дистальный % (абс.)	Левосторонний % (абс.)	Тотальный % (абс.)
	22,2(4)	18,1(4)	100(8)
Положительная экспрессия	Эндоскопическая активность		
	I % (абс.)	II % (абс.)	III % (абс.)
	20(4)	27,2(6)	66,7(4)

Результаты экспрессии данного белка у больных ЯК представлены в таблице 3.

При исследовании показателя p53 в зависимости от длительности заболевания установлено, что наиболее часто белок p53 экспрессировал в группе лиц с длительностью заболевания более 5 лет. Имеются различия в экспрессии данного маркера между группой здоровых лиц и группой пациентов с длительностью заболевания от 1 года до 5 лет ( $p \leq 0,05$ ) и более 5 лет ( $p \leq 0,03$ ).

Экспрессия p53 увеличивалась при нарастании тяжести течения ЯК. Достоверные различия получены между группой здоровых лиц и группами

пациентов со средней и тяжелой формами заболевания ( $p \leq 0,03$ ).

Примечательно, что при тотальном колите экспрессия белка p53 обнаруживалась в 100 % случаев ( $p \leq 0,03$  по сравнению с дистальным колитом). Экспрессия белка была наиболее интенсивна в участках слизистой с признаками дисплазии эпителия.

Также была выявлена зависимость экспрессии p53 от эндоскопической активности заболевания. При увеличении степени активности выраженность экспрессии p53 возрастала ( $p \leq 0,05$ ).

При сравнительном анализе полученных нами результатов и немногочисленных данных, имеющих

в литературе, было установлено, что при ЯК снижается пролиферативная активность эпителия по сравнению с такими же показателями у здоровых людей, и возрастает индекс апоптоза по мере увеличения тяжести патологического процесса [19,20].

## Выводы

1. При неспецифическом язвенном колите отмечается снижение пролиферативной активности клеток эпителия слизистой оболочки толстой кишки. Индекс пролиферации Ki-67 имеет минимальные значения при тяжелом течении НЯК, его тотальной локализации и 3 степени эндоскопической активности.
2. Увеличение показателей активации апоптоза наблюдается при увеличении клинической и эндоскопической активности неспецифического язвенного колита, а также протяженности патологического процесса в толстой кишке.
3. Появление экспрессии белка p53 у больных НЯК по сравнению со слизистой оболочкой без

Что касается изменений маркеров пролиферации и апоптоза при НЯК в зависимости от длительности заболевания, распространенности процесса и его эндоскопической активности, то такой информации в доступной нам литературе мы не встретили.

- воспалительных изменений свидетельствует о нарушении регуляции клеточного цикла. Наиболее выраженная экспрессия данного маркера в очагах дисплазии является неблагоприятным фактором, свидетельствующем о возможной опухолевой трансформации клеток.
4. Иммуногистохимическое исследование слизистой оболочки толстой кишки с определением показателей пролиферации, апоптоза, экспрессии p53 является перспективным диагностическим методом, позволяющим оценить тяжесть течения, активность воспалительного процесса при ЯК различной длительности, локализации, а также риск развития дисплазии эпителия и колоректального рака.

## Литература

1. *Da Silva B. C.* Epidemiology, demographic characteristics and prognostic predictors of ulcerative colitis / B. C. Da Silva, A. C. Lyra, R. Rocha, G. O. Santana // *World J. Gastroenterol.* — 2014. — Jul. 20 (28). — P. 9458–67.
2. *Benchimol E. I.* Changing age demographics of inflammatory bowel disease in Ontario, Canada: a population-based cohort study of epidemiology trends / E. I. Benchimol, D. G. Manuel, A. Guttman et al. // *Inflamm. Bowel Dis.* — 2014. — Oct. 20 (10). — P. 1761–9.
3. *Ng S. C.* Environmental risk factors in inflammatory bowel disease: a population-based case-control study in Asia-Pacific / S. C. Ng, W. Tang, R. W. Leong et al. // *Gut.* — 2014. — Sep. 12. — 2014–307410.
4. *Fiocchi C.* The multifactorial pathogenesis of IBD. In: *Inflammatory bowel disease — diagnostic and therapeutic strategies: Falk Symposium 154: Abstracts.* M.; 2006. — P. 21–22.
5. *Sobczak M.* Current overview of extrinsic and intrinsic factors in etiology and progression of inflammatory bowel diseases / M. Sobczak, A. Fabisiak, N. Murawska et al. // *Pharmacol. Rep.* — 2014. — Oct. 66 (5). — P. 766–75.
6. *Feuerstein J. D.* Ulcerative Colitis: Epidemiology, Diagnosis, and Management / J. D. Feuerstein, A. S. Cheifetz // *Mayo Clin. Proc.* — 2014. — Nov. 89 (11). — P. 1553–1563.
7. *Гастроэнтерология и гепатология: диагностика и лечение: руководство для врачей /* Под ред. А. В. Калинина, А. Ф. Логинова, А. И. Хазанова. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: МЕДпресс-информ, 2011. — 864 с.: ил.
8. *Herszényi L.* Colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease: the true impact of the risk / L. Herszényi, L. Barabás, P. Miheller, Z. Tulassay // *Dig. Dis.* — 2015. — 33 (1). — P. 52–7.
9. *Aalykke C.* Colonoscopy surveillance for dysplasia and colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease / C. Aalykke, M. D. Jensen, J. Fallingborg // *Dan. Med. J.* — 2015. — Jan. 62 (1). — P. 4995.
10. *Казарина А. В.* Роль пробиотической терапии в лечении рецидива и поддержании ремиссии язвенного колита / А. В. Казарина, Р. С. Назарбекова, Н. И. Овчинникова и др. // *Кремлевская медицина.* — 2009. — № 2. — С. 50–54.
11. *Bromley M.* A comparison of proliferation markers (BrdUrd, Ki-67, PCNA) determined at each cell position in the crypts of normal human colonic mucosa / M. Bromley, D. Rew, A. Becciolini et al. // *Eur. J. Histochem.* — 1996. — Vol. 40. — P. 89–100.
12. *Holt P. R.* Is Ki-67 a better proliferative marker in the colon than proliferating cell nuclear antigen? / P. R. Holt, S. F. Moss, A. M. Kapetanakis // *Cancer. epidemiol. Biomarkers. Prev.* — 1997. — № 6. — P. 131–135.
13. *Brown D.* Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology / D. Brown, K. Gatter // *Histopathology.* — 1990. — № 17. — P. 489–501.
14. *Аруин Л. И.* Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника / Л. И. Аруин, Л. Л. Капуллер, В. А. Исаков. — М.: «Триада-X», 1998. — 496 с.
15. *McCormick D.* The complexities of proliferating cell nuclear antigen / D. McCormick, P. A. Hall // *Histopathology.* — 1992. — Vol. 21. — P. 591–594.
16. *Reed J. C.* Bcl-2 and regulation of programmed cell death // *J. Cell. Biol.* — 1994. — Vol. 124. — P. 1–6.
17. *Bennett M.* Cell surface trafficking of Fas: A rapid mechanism of p53-mediated apoptosis / M. Bennett, K. McDonald, S. W. Chan et al. // *Science.* — 1998. — Vol. 282. — P. 290–293.
18. *Sabbatini P.* Essential role for p53 mediated transcription in E1A-induced apoptosis / P. Sabbatini, J. Lin, A. J. Levine et al. // *Genes Dev.* — 1995. — Vol. 9. — P. 2184–2194.
19. *Ивашкин В. Т.* Процессы апоптоза и пролиферации при патологии желудочно-кишечного тракта и печени / В. Т. Ивашкин, Т. Л. Лапина, О. Ю. Бондаренко и др. // *Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол.* — 2002. — № 6. — С. 38–43.
20. *Осадчук А. М.* Морфофункциональное обновление эпителиальных клеток толстой кишки и апудоцитов в патогенезе и прогнозировании течения неспецифического язвенного колита / А. М. Осадчук, М. А. Осадчук // *Клиническая медицина.* — 2006. — № 12. — С. 35–39.