

Клеточное обновление в кишечном эпителии в условиях реактивных изменений слизистой оболочки

Р.В. Деев*¹, Т.А. Ахмедов¹, Б.К. Комяков²

¹ Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

² Государственная медицинская академия им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург

Cell self-renewal in intestinal epithelium under conditions of cell reactive alterations

R.V. Deev*¹, T.A. Akhmedov¹, B.K. Komyakov²

¹ Military Medical academy, Saint Petersburg

² State Medical academy named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg

Выполнено гистологическое исследование биоптатов (n=52) слизистой оболочки подвздошной кишки, длительное время контактировавшей с мочой в составе мочевых резервуаров. Иммуногистохимическое исследование включало определение экспрессии энтероцитами маркеров клеточного цикла — Ki-67, Bcl2, p53. Установлено, что пролиферация эпителия активируется уже через 4–5 мес. после начала контакта с мочой. Процесс изменения пролиферативной активности включает три фазы — активацию — индекс пролиферации 70–86% (первый год); стабилизацию на уровне 70% в течение второго года и повторный подъем в последующие сроки до 97%. Высказано предположение, что подобные изменения связаны с непосредственным влиянием на стволовые клетки кишечного эпителия. Уровень экспрессии Bcl2, p53 оставался низким.

Ключевые слова: кишечный эпителий, пролиферация, апоптоз, кишечная стволовая клетка, Ki-67, Bcl2, p53, мочевой резервуар.

Эпителий кишечного типа во взаимодействии с соединительнотканной стромой формирует в кишке морфофункциональный комплекс «крипта-ворсинка», который представляет собой саморегулирующуюся систему с закономерной убылью энтероцитов, чей пул восполняется за счет пролиферации малодифференцированных клеточных элементов в крипте [1, 2]. В нижней трети крипт располагаются стволовые клетки кишечного эпителия (недифференцированные эпителиоциты), которые дивергентно дифференцируются, по крайней мере, в четырех направлениях с образованием каемчатых энтероцитов (призматических эпителиоцитов ворсинки), бокаловидных мукоцитов (бокаловидных экзокриноцитов), клеток Панета (экзокриноцитов с ацидофильными гранулами) и энтероэндокринных клеток (желудочно-кишечных эндокриноцитов) [2–5]. Очевидно, что в условиях нормального (физиологического) функционирования клеточные диффероны, входящие в состав конкретной ткани, должны находиться в стандартном (физиологическом) соотношении, обеспечивающим полноценное выполнение функций, включая физиологическую регенерацию — клеточное обновление [6]. Следует предположить, что в условиях измененной среды эти соотношения могут меняться для поддержания исходного гомеостаза ткани, следовательно, носят приспособительный характер [7]. Выражение индивидуальной (тканевой) меры компенсаторно-приспособительных морфофункциональных преобразований в тканях под воздействием различных сверхфизиологических факторов принято называть реактивностью [6].

A histological study of biopsy specimens (n=52) was carried out. The specimens were obtained from the ileum mucous membrane which had contacted with urine in new bladders for a long time. Immunohistochemistry included an assessment of enterocyte expression of cell cycle markers — Ki-67, Bcl2, p53. Epithelial proliferation was determined to be activated as early as 4–5 months after beginning to contact with urine. The process of alteration of proliferative activity consists of three phases: 1) activation, the proliferation index is 70–86% (during the first year), 2) stabilization at the level of 70% during the second year, and 3) recurrent increase up to 97% later on. There is a hypothesis that similar alterations are due to direct influence of intestinal epithelium on stem cells. The expression level of Bcl2, p53 remained low.

Key words: intestinal epithelium, proliferation, apoptosis, intestinal stem cell, Ki-67, Bcl2, p53, new bladder.

Мочевые резервуары представляют собой биоартифициальные вместители для мочи, формируемые из различных отделов кишечной трубки. Наибольшее распространение получили тонкокишечные мочевые резервуары. Их функционирование сопряжено с рядом необычных условий, одним из которых является существование эпителия кишечного типа в нефизиологических для него условиях. Под воздействием компонентов мочи слизистая оболочка претерпевает ряд реактивных изменений, в том числе связанных с изменением клеточного цикла. Последнее обстоятельство представляется весьма актуальным, поскольку в значительной степени определяет прогноз для пациента, свидетельствует о риске злокачественной трансформации.

Считается, что позиция стволовых клеток кишечного эпителия соответствует 4–5 клетке в крипте [1, 4, 5]. Последние выглядят как бескаемчатые энтероциты. На светооптическом уровне они отличаются от дифференцированных клеток меньшими размерами, большей базофилией цитоплазмы, слабым развитием структурных признаков специализации [8], в базальной части клетки имеется относительно крупное округлое ядро. Электронномикроскопически в их цитоплазме обнаруживаются мелкие округлые митохондрии, 2–3 уплощенные цистерны комплекса Гольджи, немногочисленные, равномерно распределенные по цитоплазме профили гранулярной эндоплазматической сети [2]. Вместе с тем, биохимическая активность, основанная на экспрессии специфического для недифференцированных (стволовых) энтероцитов паттерна генов позволяет

* e-mail: romdey@gmail.com

идентифицировать их в эпителиальном ряду. Они и их ближайшие потомки характеризуются активной экспрессией белка Ki-67. Энтероциты вступают в дифференцировку лишь после 4-го митоза, слизистые клетки становятся различимыми после 3-го деления предшественников на уровне 10–15 клеточных позиций. Предшественники энтероэндокринных клеток вступают в деление всего дважды, причем 2-е деление происходит на уровне 4–6 позиций. Клетки Панета дифференцируются сразу из разделившихся стволовых клеток. Они не мигрируют к вершине ворсинки и всегда сохраняются на дне крипт.

В экспериментах с предшественником синтеза РНК [³H]уридином показано, что его включение происходит только в клетках крипт, что говорит о том, что для реализации своих специфических функций дифференцированные энтероциты используют РНК, накопленную в недифференцированном состоянии, а по мере дифференцировки процессы транскрипции с ДНК блокируются [8], вероятно блокируется и митоз.

Получены данные, согласно которым клетки крипт, находящиеся в 4–5 позиции, экспрессируют антиапоптотические белки, в частности Bcl2. Активная супрессия запрограммированной клеточной гибели, по мнению Л.И. Аруина (1998), может маркировать пул стволовых энтероцитов [1, 9]. Однако надежных и однозначных маркеров этих клеток пока нет [10]. К сегодняшнему дню описано множество экспрессируемых белков, совокупность которых характерна именно для энтероцитов, локализованных в 4–5 позиции: активность теломеразы, Tcf4, EphB3, P-PTEN, P-Akt, Noggin, Lgr5, Vmi-1 [4, 5].

Цель исследования – определить закономерности изменения клеточного обновления кишечного эпителия в мочевых резервуарах, сформированных из подвздошной кишки.

Материал и методы

Исследование выполнено на материале щипковых биопсий (n=52), полученных во время диагностических цистоскопий у пациентов (N=31), перенесших реконструктивную илеоцистопластику в сроки от 4 до 72 мес. Материал нормальной подвздошной кишки получали интраоперационно.

После стандартной гистологической обработки изготавливали гистологические срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином. При изучении препаратов обращали внимание на состояние гистоархитектоники слизистой оболочки, сохранность структурно-функциональных единиц, целостность эпителиального пласта, выраженность воспалительных процессов.

Для оценки процессов пролиферации и апоптоза выполняли иммуногистохимическое исследование. Реакции ставили методом EnVision™/HRP (DakoCytomation, Дания). Для демаскировки антигенов депарафинированные срезы подвергали высокотемпературной обработке на водяной бане в цитратном буфере (pH=6,0) (98°C, 25 мин.). Далее срезы инкубировали с первичными антителами Ki-67 (клон MIB-1, DakoCytomation, Дания) – для выявления пула пролиферирующих клеток; Bcl2 (клон 124, DakoCytomation, Дания) – для выявления клеток, в которых блокирован апоптоз; мутантный p53 (клон DO-7, DakoCytomation, Дания) – для определения клеток, в которых блокирован процесс апоптоза и имеются предпосылки к злокачественной трансформации. Для визуализации продукта иммуногистохимической реакции использовали диаминобензидин DAB-kit (DakoCytomation, Дания). Результат положительной

реакции: темно-коричневое ядерное окрашивание – для Ki-67 и p53; ядерное и цитоплазматическое окрашивание – для Bcl2.

Выполняли морфометрическое исследование, в ходе которого определяли долю положительно окрашенных клеток в системе «крипта-ворсинка», при этом анализировали не менее 1000 эпителиоцитов в препарате.

Результаты и обсуждение

При изучении гистологических препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, выявлено, что слизистая оболочка претерпевает существенные изменения. В основном они сводятся к изменению архитектоники систем «крипта-ворсинка». Ворсинки подвергаются атрофии, в то время как в течение десятков месяцев крипты сохраняют свою глубину. Отмечается резкое увеличение количества бокаловидных клеток, особенно в биоптатах, полученных в раннюю фазу реактивного процесса компенсаторной перестройки – в первые 2–3 года (до 5), в дальнейшем их число постепенно снижалось. При иммуногистохимическом исследовании процессов клеточного обновления в эпителии, выстилающем мочевые резервуары, удалось выявить ряд характерных изменений.

Установлено, что при попадании кишечного эпителия в условия постоянного контакта с мочой происходит значимое усиление пролиферации. Так, уже через 4–5 мес. доля делящихся в крипте энтероцитов достигала 70–86%, в то время как в норме Ki-67⁺ клетки наблюдаются в криптах с 5 по 19 клеточные позиции, что, по нашим данным, составляет около 60% от всех клеток в крипте. Следует отметить, что в условиях реактивных изменений всей слизистой оболочки пролиферирующие клетки также обнаружены на ворсинках, что в обычных условиях не наблюдается, а также среди клеток Панета (рис. 1А, Б, В).

Через год ядра энтероцитов приобретали вытянутую форму, в целом клетки характеризовались плотным расположением и высокой интенсивностью пролиферативных процессов. Через 15 мес. значительная часть энтероцитов в крипте имели фенотип бокаловидных мукоцитов, их ядра были положительно окрашены в ходе иммуногистохимической реакции (рис. 2А).

В дальнейшем пролиферативная активность в течение десятков месяцев сохранялась на уровне превышения нормы, а к наиболее поздним срокам наблюдений – 72 мес. достигла в крипте уровня 97%. Кроме того, через 72 мес. при нарастающих явлениях атрофии ворсинок и ядерного полиморфизма покрывающих их эпителиоцитов, отмечается пролиферация большого числа клеток – до 20–30% энтероцитов, причем, экспрессия белка характерна и для фенотипически дифференцированных форм – бокаловидных мукоцитов (рис. 2Б). Отмечалась тенденция к тому, что ядра клеток расположенных ближе к вершинам ворсинок прокрашивались менее интенсивно, чем находящиеся у ее основания.

Трактовка иммуногистохимических данных по выявлению белков клеточного цикла в любых тканях, как в норме, так и при пограничных состояниях весьма сложна и, в ряде случаев неоднозначна [1]. До появления маркеров пролиферативной активности – Ki-67 и PCNA, процесс пролиферации возможно было установить либо непосредственно регистрацией фигур митоза, либо при помощи автордиографии. Митоз включает в себя помимо кариокинеза подготовительные и последующие фазы, оставшиеся за пределами получаемых данных. Поскольку Ki-67 маркирует клетки в течение всех фаз митоза за исключением G₀ (PCNA – только S-фазу) его

можно признать наиболее достоверным показателем пролиферативной активности [11, 12]. С учетом короткого срока жизни энтероцитов (около 3–4 сут.) процесс деления (несколько часов, по некоторым данным – до 10 [11]) занимает достаточно важную часть жизни клетки. Вероятно, именно этим объясняется и постепенное уменьшение интенсивности окраски от основания ворсинки к ее вершине. Кроме того, значимое увеличение доли делящихся клеток как в крипте, так и на ворсинках на поздних сроках наблюдения может свидетельствовать об увеличении скорости клеточного обновления в условиях реактивных изменений. В результате этого на

ворсинку выходят энтероциты, не завершившие дифференцировку и дифференцирующиеся уже на месте, что подтверждается и обнаружением большого числа положительно окрашенных клеток на ворсинках и постепенным уменьшением интенсивности окрашивания от крипты к ворсинке. Этим же может быть объяснено и обнаружение Ki-67⁺ бокаловидных клеток. Вместе с тем, по современным представлениям, бокаловидные мукоциты, являясь дифференцированным клеточным типом, способны в некоторых условиях к дальнейшей дифференцировке [13], возможно необратимо не блокирован и их пролиферативный потенциал.

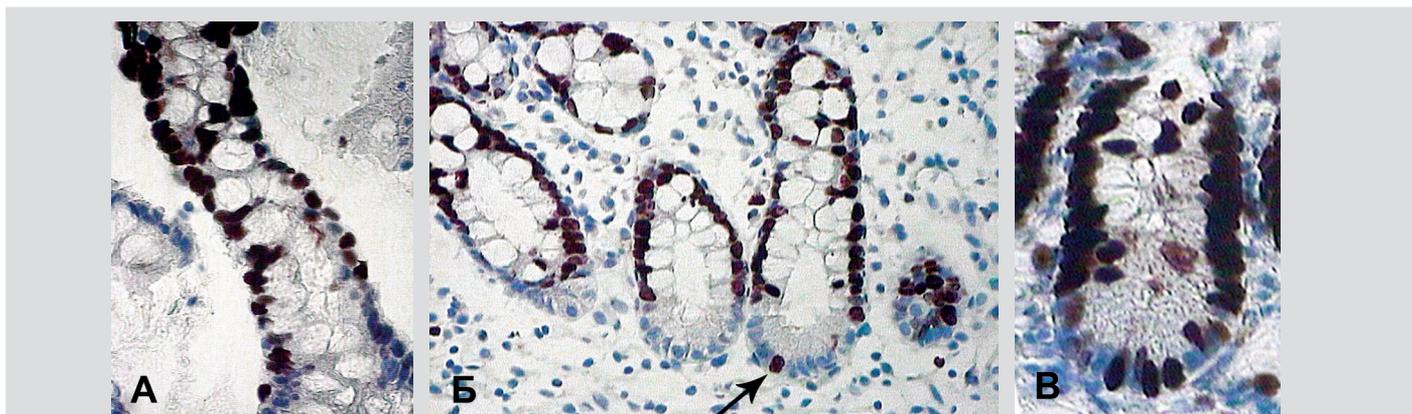


Рис. 1. Экспрессия Ki-67 в эпителиоцитах подвздошной кишки в условиях реактивных изменений: А – ворсинка, 4 мес.; Б – крипты, 15 мес.; В – положительно окрашенные клетки Панета, 4,5 мес. Стрелка – Ki-67⁺ клетка. Окраска: анти-Ki-67 и гематоксилин. Ув.: А, Б – $\times 100$, В – $\times 250$

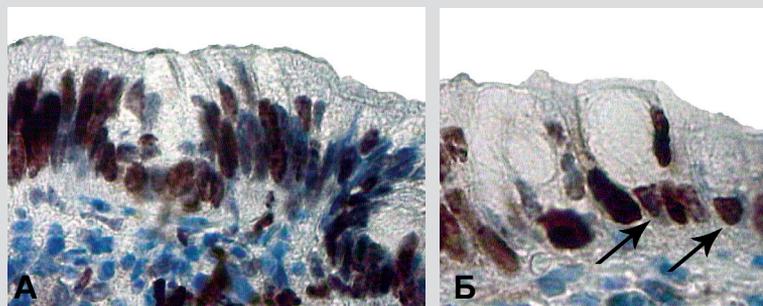


Рис. 2. Экспрессия Ki-67 в эпителиоцитах подвздошной кишки в условиях реактивных изменений: А – поверхностный эпителий, 12 мес.; Б – экспрессия Ki-67 бокаловидными клетками, 72 мес. Стрелки – Ki-67⁺ клетки. Окраска: анти-Ki-67 и гематоксилин. Ув.: А – $\times 250$, Б – $\times 400$

Обнаружение положительно окрашенных клеток в дне крипты – между клетками Панета может демонстрировать сохранение ими пролиферативных возможностей. Полученные данные имеют особое звучание в свете разрабатываемой гипотезы о том, что среди них имеется некоторое число клеток, выполняющих роль собственного камбиального резерва, активирующегося при необходимости, то есть способных к независимому самообновлению [14], что важно для поддержания гомеостаза в крипте при экстремальных воздействиях. Является ли это явление физиологичным или данный механизм включается только в условиях реактивных изменений остается неясным.

Количественные показатели митотической активности, полученные нами (табл.), демонстрируют тенденцию развития реактивных изменений в эпителии подвздошной кишки в условиях контакта с мочой, которая заключается в быстрой активации этого процесса уже через 4–4,5 мес., с последующей стабилизацией и вторичным резким усилением после 2 лет воздействия мочи.

Несколько иные результаты были получены А.Е. Dellis и соавт. (2008), которые на материале от 50 пациентов в сроки, соответствующие нашему исследованию, показали, что пролиферация энтероцитов в этих условиях нарастает лишь с 6-го мес. Несмотря на схожесть тенденции, доля пролиферирующих клеток, определенная авторами, значимо отличалась от наших данных на всех сроках и не превышала 20% [15]. Объяснением этому может служить тот факт, что авторы вычисляли среднюю долю положительно окрашенных ядер для всех энтероцитов эпителиальной выстилки, без учета их топографической локализации. Подобный подход может быть оправдан на самых поздних сроках наблюдений, когда атрофия ворсинок достигает весьма значимых показателей и становится невозможным провести четкую границу между криптой и ворсинкой. Однако остается неясным, почему во всех случаях пролиферативная активность реактивно измененных энтероцитов, определенная с использованием антител к Ki-67 была значительно ниже, чем в норме.

Экспрессия маркеров клеточного цикла в эпителии мочевого резервуара

Срок (мес.)	Ki-67 (%)			Bcl2 (%)			p53 (%)		
	крипта	ворсинка	средний показатель	крипта	ворсинка	средний показатель	крипта	ворсинка	средний показатель
Норма	66	0	30	1	0	0,4	0	0	0
4	71	5	38	5	1,6	3,3	10	1	4,5
4,5	86,2	5	45	0,8	1,3	1	6,8	0,6	5,5
12	86,5	22	54,2	–	–	–	7,4	0	3
15	76	3	39,6	4,5	2,3	1,3	3,3	0,5	1,9
19	60	17	38,5	2,4	1,6	2	0	0	0
31	94	31	62,5	0	0	0	0	0	0
72	97	–	40	0	0	0	3	14,0	6,4

В 1999 г. группа итальянских авторов получила данные, свидетельствующие о похожей динамике. По материалу исследования биопсий от 30 пациентов в сроки до 48 мес. было показано снижение уровня пролиферации всего эпителиального пласта до 53% в течение первого года и дальнейшего двукратное увеличение в оставшиеся сроки [16].

В отечественном исследовании, повышение показателя пролиферации отмечалось лишь в поздние сроки — спустя 6 лет после операции [17]. Однако, примененные авторами методики математического и статистического анализа делают невозможным сопоставление собственных данных с их результатами.

Экспрессия Bcl2, являющегося одним из маркеров клеток, в которых подавлен апоптоз, на всех сроках наблюдения была на низком уровне, однако в ряде случаев значимо превышала нормальные показатели для подвздошной кишки (см. табл.). Полученные результаты показывают, что значимое усиление экспрессии Bcl2 по сравнению с нормальной подвздошной кишкой отмечается только через год-полтора и достаточно быстро снижается вплоть до полного отсутствия, следовательно,

предполагать явное усиление апоптоза на фоне реактивных изменений энтероцитов оснований нет.

Bcl2⁺ клетки располагались преимущественно в строме ворсинок и соединительной ткани собственной пластинки в виде округлых клеток, являющихся, по-видимому, различными субпопуляциями лимфоцитов. Обнаруживались они и в эпителиальном пласте в виде межэпителиальных лимфоцитов. Экспрессия Bcl2 эпителиоцитами отмечалась как в виде ядерного, так и бледного цитоплазматического окрашивания. Последнее не противоречит как протоколу фирмы-производителя, так и данным иных авторов, и обусловлено нахождением данного белка в мембране митохондрий. Положительно окрашенные ядра энтероцитов всегда были малочисленными (рис. 3А). Следует отметить, что через 4 мес. эпителиальные клетки с выраженным цитоплазматическим окрашиванием появлялись среди клеток Панета, (рис. 3Б), позже — они исчезали. Сходные результаты были получены в исследовании [15]. Авторы установили аналогичную тенденцию — постепенное увеличение Bcl2⁺ клеток в срок до 12–24 мес. с последующим уменьшением экспрессии.

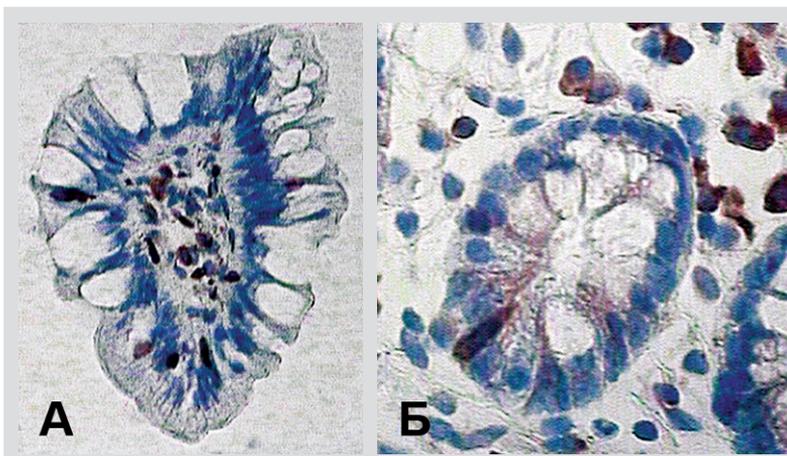


Рис. 3.
Экспрессия Bcl2 в эпителиоцитах подвздошной кишки в условиях реактивных изменений:
А – ворсинка, поперечный срез, 15 мес.;
Б – Bcl2⁺ клетки среди клеток Панета, тангенсальный срез, 4,5 мес.
Окраска: анти-Bcl2 и гематоксилин.
Ув.: А – ×100, Б – ×250

Подавление апоптоза на всех сроках наблюдения не носило выраженного характера, что вероятно связано с незначительной индукцией апоптоза компонентами мочи. Выявление большого количества $Bcl2^+$ клеток могло бы свидетельствовать об иммортализации энтероцитов, что, в свою очередь маркировало бы опасность их онкотрансформации.

Экспрессия мутантного p53 — характерный признак трансформированных клеток, у которых, в отличие от нормальных, измененный p53 не может выполнить свою функцию — инициировать апоптоз при повреждении генома. Он обнаруживается не только в опухолях, но и при различных дисплазиях, воспалении и др. [1, 18]. В эпителии нормальной подвздошной кишки нами не выявлена его экспрессия как в крипте, так и на ворсинках. В эпителиоцитах мочевого резервуара в первый год функционирования до 10% эпителиоцитов крипты были p53-положительными, на ворсинках их количество было существенно ниже (см. табл.). При этом у некоторых пациентов белок найти вообще не удалось — как правило, на 2–3-м году контакта слизистой оболочки с мочой.

Следовательно, процессы изменения динамики клеточного обновления в эпителии в условиях реактивных изменений, сопряженных как с непосредственным действием компонентов мочи, так и активацией в составе стромы клеток кроветворного ряда — лимфоцитов, гранулоцитов, тучных клеток — вырабатывающих большой

спектр биологически активных веществ, являющихся цитокинами и регуляторами клеточного цикла приводят к обнаруженным изменениям: резкому усилению пролиферации уже в первые месяцы, постепенному выходу на «плато» к срокам 3–5 лет и в дальнейшем — росту этого показателя. Очевидно, что такое усиление пролиферативной активности приводит к выходу малодифференцированных клеток на ворсинки и их более полному контакту с компонентами мочи. На этом фоне мы констатируем преимущественную мукоцитарную дифференцировку энтероцитов, что отчасти, возможно, нивелирует патогенное действие мочи на клетки. При этом — увеличение доли пролиферативной активности на поздних сроках создает реальный риск значимых с точки зрения онкологической трансформации. Об этом же свидетельствует появление клеток положительных на мутантный p53. Процесс этот двухфазный. Первая фаза занимает первый год, в дальнейшем, когда в целом в слизистой оболочке нарастают адаптационные структурные преобразования, его экспрессия снижается.

Следует отметить, что полученные данные, несмотря на свидетельства в пользу усиления пролиферативной активности энтероцитов и их самообновления, подтверждают устойчивость эпителия подвздошной кишки к неконтролируемому росту — значительному, генетически обусловленному контролю над этим процессом в системе «крипта-ворсинка».

ЛИТЕРАТУРА:

1. Аруин Л.И., Капуллер Л.Л., Исаков В.А. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника. М.: Трида-Х; 1998: 496.
2. Зуфаров К.А., Юлдашев А.Ю. Тонкая кишка. В кн.: Руководство по гистологии. СПб.: СпецЛит; 2; 2001: 115–40.
3. Международная гистологическая номенклатура / Под ред. В.В. Семченко, Р.П. Самусева, М.В. Моисеева, З.Л. Колосовой. Омск: Омская медицинская академия; 1999: 156.
4. Li L., Xie T. Stem Cell Niche: Structure and Function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2005; 21: 605–31.
5. Booth C., Potten C.S. Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. *J. Clin. Invest.* 2000; 105: 1493–99.
6. Клишов А.А. Гистогенез и регенерация тканей. Л.: Медицина; 1984: 232.
7. Деев Р.В., Ахмедов Т.А. Реактивные изменения эпителия подвздошной кишки в составе мочевых резервуаров. Вопросы морфологии XXI века. Сборник научных трудов, посвященный 100-летию кафедры медицинской биологии СПбГМА им. И.И. Мечникова. СПб.; 1; 2008: 107–14.
8. Заварзин А.А. Сравнительная гистология. СПб.: Из-во С.-Петербургского государственного университета; 2000: 520.
9. Merritt A., Potten C., Watson A. et al. Differential expression of *bcl-2* in intestinal epithelia. *J. Cell Sci.* 1995; 108: 2261–71.
10. Bjerknes M., Cheng H. Gastrointestinal stem cells. II. Intestinal stem

- cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2005; 289(3): G381–7.
11. Бондарева В.А., Шпонька И.С. Значение прогностических маркеров опухолевой прогрессии Ki-67 и p53 в опухолях молочной железы. *Морфология* 2007; 1(1): 40–44.
12. Brown D.C., Gatter K.C. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology* 1990; 17: 489–503.
13. Костюкевич С.В. Эндокринный аппарат эпителия слизистой оболочки толстой кишки отдельных представителей позвоночных животных и человека в норме и при некоторых видах патологии. Дис. ... док. мед. наук. СПб.; 2004: 263.
14. Scoville D.H., Sato T., He X.C., Li L. Current View: Intestinal Stem Cells and Signaling. *Gastroenterol.* 2008; 134(3): 849–64.
15. Dellis A.E., Demonakou M., Papatsoris A.G. et al. Insight into long-term histological, proliferative and apoptotic modifications in ileal orthotopic neobladder and conduit mucosa. *Tumori* 2008; 94: 701–5.
16. Gatti R., Ferretti S., Bucci G. et al. Histological Adaptation of Orthotopic Ileal Neobladder Mucosa: 4-Year Follow-Up of 30 Patients. *Eur. Urol.* 1999; 36: 588–94.
17. Дариенко Р.О. Клинико-морфологическая адаптация артериального мочевого пузыря. Дис. ... кандидата мед. наук. СПб.; 2008: 168.
18. Linden M., Nathanson S., Zarbo R. Evaluation of anti-p53 antibody staining immunoreactivity in benign tumors and nonneoplastic tissue. *Appl. Immunohistochem.* 1995; 3: 232–8.

Поступила 23.02.2009