

УДК 611.3.018.025:612.017.1

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛОКАЛЬНОГО ИММУННОГО ГОМЕОСТАЗА СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖКТ

Рева И.В., Усов В.В., Ломакин А.В., Ковалёва И.В., Григорян Л.А., Нишикура К.,
Аджиока Т., Ямамото Т., Рева Г.В.

*ГОУ ВПО «Владивостокский государственный медицинский университет»,
Владивосток, e-mail: vgtm.ru;*

Медицинский факультет университета Ниигата, Ниигата, Япония, e-mail: avers@yandex.ru

Гистологическими и иммуногистохимическими методами на выявление иммуноцитов маркерами CD4, CD8, CD 68, CD 163, CD204 изучены клетки иммунофагоцитарного звена в слизистой оболочке стенки желудка у детей в возрасте от 5 месяцев до 3-х лет. Рассмотрена роль клеток иммунофагоцитарного звена слизистой оболочки желудка в патогенезе вторичной гиполактазии. Установлено, что у детей с вторичной гиполактазией в слизистой оболочке желудка в 95% иммуногистохимическими маркерами выявлено присутствие HbP и установлено изменение соотношений иммуноцитов клеточного и гуморального звена в зависимости от клинических проявлений и стадии заболевания. Полученные данные способствуют раскрытию механизмов альтерации и репаративной регенерации при вторичной гиполактазии у детей до 3-х лет, могут служить моделью для разработки алгоритма иммуномодулированного ответа при применении лечебных препаратов, а также для мониторинга морфологического анализа состояния слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта у детей при различных патологических процессах, сопровождающихся мальабсорбцией и гиполактазией.

Ключевые слова: слизистая оболочка, локальный иммунный гомеостаз, иммунофагоциты, эпителиальный барьер

IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERISTIC LOCAL IMMUNOLOGY HOMEOSTASIS MUCOSAL LAYER IN GASTROINTESTINAL TRACT

Reva I.V., Usov V.V., Lomakin A.V., Kovaleva I.V., Grigoryan L.A., Nishikura K.,
Adgioka T., Yamamoto T., Reva G.V.

Vladivostok state medical university, Vladivostok, e-mail: vgtm.ru;

Division of Bacteriology, Department of Infectious Disease Control and international Medical and Dental Sciences, e-mail: avers@yandex.ru

We are study immunocytes CD4, CD8, CD 68, CD 163, CD204 immunohistochemical methods in gastrointestinal of children with age from 5 month to 3 years old. It was examine the role of cells in immunophagocytes pul of gaster mucosa in pathogenesis 2-nd hypolactase. It was determined 95% case HbP infection in tunica mucosa in children with 2-nd hypolactase and it was reveald changes correlation immunocytes of cells and humoral immunity dependent on clinical display and stages of disease. Acknowledge results promote uncover mechanisms alteration and reparative regeneration in children to 3 years old with 2-nd, may be model for elaborate algorithm immunomodulation answered in treatment, and for monitoring morphological analysis mucosal of gastrointestinal tract of children with difference pathological processes, accompany malabsorbition and hypolactase.

Keywords: mucosal layer, local immunity homeostasis, epithelial barrier, immunophagocytes

Педиатрам в своей практике приходится встречаться с так называемой вторичной и транзиторной лактазной недостаточностью, развивающейся на фоне различных заболеваний желудочно-кишечного тракта и сопутствующей внекишечной патологии, что делает проблему современной диагностики сопутствующей ферментопатии у детей первых лет жизни весьма актуальной [5, 17].

Анализ работ, посвященных лактазной недостаточности у детей, показывает наличие многочисленных данных о состоянии слизистой оболочки тонкой кишки, при этом отсутствуют сведения о барьерных свойствах и локальном иммунном гомеостазе эпителиальной пластинки в других отделах ЖКТ [2, 7]. Имеющиеся данные о развитии гиполактазии при удалении пилорического отдела желудка ставят на повестку дня вопрос о роли изменений слизистой оболочки

желудка в этой патологии. Не изучено состояние слизистой оболочки желудка при различных патогенетических вариантах лактазной недостаточности у детей грудного возраста [10]. Отсутствуют сведения о влиянии функционального состояния слизистой желудка на характер течения болезни, на выбор адекватной терапии. Поэтому до настоящего времени остается ряд нерешенных и спорных вопросов как в диагностике, лечении, так и в разработке профилактических мероприятий гиполактазии у детей. Гистологические данные по структуре слизистой оболочки новорожденных и у детей в возрасте от 9 месяцев до 3-х лет жизни в доступной литературе практически отсутствуют, что не позволяет составить целостную патогенетическую концепцию заболеваний, сопровождающихся вторичной гиполактазией [6, 9].

Цель исследования: изучить роль иммунофагоцитарного звена слизистой оболочки желудка в патогенетических аспектах развития вторичной лактазной недостаточности.

Задачи. Дать гистологическую характеристику слизистой оболочки желудка детей в возрасте с 5 месяцев до 3-х лет постнатального онтогенеза; провести мониторинг клеток иммунофагоцитарного звена в слизистой оболочке желудка детей в возрасте от 5 месяцев до 3-х лет постнатального онтогенеза в различные стадии клинических проявлений вторичной гиполактазии; установить значение иммунофагоцитарного звена в патогенезе вторичной гиполактазии.

Материалы и методы исследования

Материал для исследования получен на базе ККЦ СВМП (материнства и детства) г. Владивостока в течение 2008–2011 гг.

Обследовано 63 ребенка в возрасте от 4 до 18 месяцев с дефицитом массы тела от 10 до 30%. Проведенный анализ анамнестических (наличие персистирующей кислой диареи), лабораторных данных (положительная реакция Бенедикта, стеаторея смешанного типа, амилорея) позволил выявить вторичную лактазную недостаточность.

Всем пациентам в периоде выраженных клинических проявлений проведена эзофагогастроэнтероскопия с гастробиопсией с учётом рекомендаций Bishop P.R., Nowicki M.J., May W.L. (2002) [3, 4, 12]. Кроме этого, 25 из 63 пациентов с плохими прибавками в весе в динамике, анемией проведено повторное исследование с интервалом от 6 до 12 мес. Для эндоскопического исследования верхних отделов желудочно-кишечного тракта использовались фиброволоконные аппараты фирмы Pentax марки FG24V и FG29V с торцевым расположением оптики, фарцепты с чашечкообразными браншами стандартного типа KW-2415S и KW-1815S для щипцовой биопсии. Для осмотра тонкой кишки ниже связки Трейца пользовались стандартным педиатрическим эзофагогастроскопом с диаметром рабочей части 7,8 мм. Методика позволяет последовательно в течение одной процедуры осмотреть пищевод, желудок, двенадцатиперстную кишку и проксимальные отделы тощей кишки (уровень связки Трейца) и провести прицельную биопсию.

Всем обследуемым производили забор пристеночной слизи с помощью эндоскопа с щёточной насадкой «Pentax» из различных отделов желудка для установления морфологической картины I звена локального иммунного барьера слизистой оболочки. Из полученного материала готовили мазки.

Эндоскопическое исследование пищевода, желудка, тонкой кишки с биопсией слизистой оболочки выполнено 63 детям. Анализ полученных данных проводили при помощи специализированной программы Medical Vision.

Биоптаты были взяты из кардиального, антрального и фундального отделов желудка согласно Сиднейской системе в соответствии с золотым стандартом ВОЗ. Интерпретация результатов осуществлялась в соответствии с критериями морфологического раздела Сиднейской классификации, до-

полнений международной классификации гастрита и визуально-аналоговой шкалы с эталонами полуколичественной оценки морфологических изменений [6, 7]. Всего от 63-х детей было получено и проанализировано 158 мазков пристеночной слизи и 174 биоптата различных отделов слизистой оболочки желудка. Биоптаты слизистой оболочки желудка заливали в парафин по стандартной методике для иммуногистохимических исследований с использованием автоматизированных систем заливки и получения серийных срезов на базе патоморфологической лаборатории университета Ниигата.

Срезы толщиной 3–5 мкм окрашивали гематоксилин-эозином классическим способом для получения общей морфологической картины, а также с применением автоматизированных систем для иммуногистохимических методов с применением моноклональных антител. Использованы современные высокочувствительные иммуногистохимические методы EPOS и En Vision. С помощью иммунной гистохимии выявлены различные фенотипы клеток моноцитарного пула по дифферону ССК, а также тучные клетки в соединительной ткани собственной пластинки слизистой оболочки. Выявляли CD4, CD8, CD68, CD163, CD204, маркерами фирмы DAKO для иллюстрации и последующего сравнительного анализа динамики их количества в разные периоды заболевания. Получена характеристика участия иммуноцитов в механизмах перестройки соединительно-тканых структур собственной и эпителиальной пластинок слизистой в физиологической и репаративной регенерации стенки желудка.

Идентификация иммунокомпетентных клеток проводилась по одинаковой схеме, несмотря на различную локализацию антигена в клеточных структурах: мембраны, лизосомы, ядра, комплекс Гольджи.

Демаскировка антигенных детерминант проводилась в стеклянном контейнере, заполненном восстанавливающим раствором, и созданием условий водяной бани в течение 1 часа. Часть препаратов обработана с помощью микроволнового излучения, которое даёт лучший демаскировочный эффект, в течение получаса. Для демаскировки антигенов применяли 10 ммоль/л цитратный буфер, рН 6,0 или DAKO TRS (Target retrieval solution, code № S 1700). Остывшие препараты промывали в дистиллированной воде. Использовали антитела в разведении 1:50 и 1:100. Окрашивание коричневого цвета свидетельствовало о положительной реакции.

Подсчёт клеток производили в 100 полях зрения в 160 срезах. При этом определяли общее количество иммуноцитов в поле зрения и анализировали степень их окрашивания.

Фон и неспецифическое окрашивание исключали, строго соблюдая условия и алгоритм протокола методики – температуру, рН, время. Для блокирования неспецифического окрашивания срезы в течение 20 минут инкубировали с неиммунной сывороткой, а уже затем инкубировали с первичными антителами. Для контроля и исключения артефактов при выполнении исследований часть препаратов обрабатывали дважды только неиммунной сывороткой.

В препаратах желудка измерялась относительная толщина эпителиальной пластинки, о состоянии слизистой оболочки судили по величине, количеству и глубине желёз в различных отделах стенки желудка. Кроме того, подсчитывали интразитительные лимфоциты (в пересчёте на 1000 ядер), а также плот-

ность клеточного инфильтрата собственного слоя слизистой оболочки на 1 мм² и процентное соотношение клеточного состава.

Анализ мазков проводили с помощью фазово-контрастной микроскопии при иммерсионном увеличении $\times 1000$, изучение срезов выполнено на микроскопе Olympus Vx72 с цифровой фотокамерой и фирменным компьютерным программным обеспечением.

Результаты исследования и их обсуждение

У всех 63 больных в периоде выраженных клинических проявлений лактазной недостаточности установлено нарушение структуры слизистой оболочки желудка. Визуально она была рыхлой и отечной. Очаговая гиперемия в области антрального отдела наблюдалась у 41 пациента, что согласуется с наблюдениями развивающейся гиполактазии у больных с удалённым пилорическим отделом желудка и свидетельствует о неизвестной патогенетической роли этой части желудка в развитии гиполактазии [14]. Наличие папулезных элементов зарегистрировано у 4-х больных. Заброс желчи в желудок обнаружен в 5 случаях.

Повышенную кислотообразующую функцию желудка на фоне кислой диареи имели 10 больных, у остальных детей эта функция была сохранена.

На фоне клинической ремиссии и нормализации стула при фиброгастроудоденоскопии визуально изменения слизистой оболочки желудка сохранялись у 18 детей. Реактивная гастропатия, сопровождавшаяся отеком с гиперемией по вершинам складок, отмечалась у 14 пациентов. Папулезная гастропатия зарегистрирована у 16 пациентов. При динамическом наблюдении в период полной ремиссии клинических проявлений лактазной недостаточности изменения слизистой оболочки желудка практически полностью купировались и сохранялись лишь в 2 случаях. Эти изменения имели характер поверхностной (эритематозной) гастропатии. При первичном обследовании у 63 больных с гиполактазией визуальные изменения слизистой оболочки тонкой кишки в виде отека и гиперемии наблюдали у 47 детей. Симптом «манной крупы», усилившийся в дистальном направлении, определялся у 13 пациентов. Визуально определяемые изменения слизистой оболочки тонкой кишки у детей с лактазной недостаточностью полностью купировались при исчезновении клинических проявлений заболвания.

Сверху слой эпителиоцитов покрыт толстым слоем слизи, в состав которой, помимо муцинов, входят антибактериальные неспецифические защитные факторы (ли-

зоцим, лактоферрин, дефенсины, миелопероксидаза, низкомолекулярные катионные пептиды, компоненты комплемента и др.), а также иммуноглобулины классов IgA, IgM и IgG [13]. Слизь и ее компоненты образуются за счет секрета мелких желез, расположенных в подслизистой оболочке, а также работы одноклеточных желез эпителия – бокаловидных клеток. Важным фактором неспецифической резистентности слизистой оболочки является мукоцилиарный клиренс, связанный с работой ресничек эпителиоцитов. Нарушения мукоцилиарного клиренса, обусловленные генетическими дефектами, воздействием вирусов или бактериальных токсинов, сами по себе могут стать важным патогенетическим фактором (синдром Картагенера) [11]. Неспецифические реакции связаны не только с гуморальными, но и с клеточными факторами. Нейтрофилы и макрофаги, мигрирующие из кровеносного русла, способны проходить между эпителиоцитами, выходить на поверхность слизистой оболочки и уничтожать микроорганизмы путем фагоцитоза, за счет секреторной дегрануляции, продукции активных форм кислорода и оксида азота (NO) [15]. Подробного исчерпывающего анализа состояния мукоцилиарного барьера слизистой оболочки с изучением клеточных элементов и их соотношений на поверхности эпителиального пласта, определения эффекторных клеток, в доступной литературе мы не встретили.

Мазки, полученные нами из пристеночной слизи желудка больных детей, изученные с помощью фазово-контрастной микроскопии, содержали дендритные клетки, лимфоциты, макрофаги, нейтрофилы и слущенные каёмчатые эпителиальные клетки.

Выявленные нейтрофилы имели ядра, состоящие из 3-х и более сегментов. В цитоплазме и на клеточной поверхности идентифицировались везикулы. Из анализа результатов следует важный вывод. Изменение внутренней среды организма, наблюдающееся при вторичной гиполактазии у детей, фиксируется системой фагоцитоза. Являясь мощными эффекторами, фагоциты превращаются в регуляторы трансформации всех реакций крови, соединительной ткани и эпителиальных пластов. Особенно показательны в таких реакциях нейтрофилы. Обмениваясь в циркуляции каждые 5 ч, покидая сосуды в случае изменений местного иммунитета, они как бы фотографируют сдвиги, которые происходят в течение этого периода, являясь своеобразным зеркалом гомеостаза. Мы считаем, что необходимо разработать индикаторные тесты, основан-

ные на высокой реактивности полинуклеаров, чтобы использовать их в клинике, так как по информативности они нередко превосходят другие гематологические показатели. Также в пристеночной слизи нами выявлены лимфоциты (рис. 3 а, б, в), размерами до 10 мкм. Гистологическая картина данных клеток

Макрофаги (см. рис. 1) имели размеры до 20×25 мкм, большое количество фагосом в цитоплазме и чётко идентифицирующееся ядро, расположенное центрально. Поверхность макрофагов характеризовалась многочисленными инвагинациями, глубиной до 2-х мкм, что свидетельствует о контактных взаимодействиях между клетками этой

группы, а также о процессах деления. Выявленные нами лимфоидные клетки могут относиться к самостоятельному и самовоспроизводящемуся пулу интраэпителиальных лимфоцитов, заселяющих эпителиальную пластинку слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта до рождения, пролиферативно не зависящих от СКК – стволовых клеток крови, ответственных за лимфопоз и противодействующих микробной контаминации. Полученные с помощью фазово-контрастной диагностики данные позволили внести дополнения в имеющиеся современные представления о первом звене местного иммунного гомеостаза слизистой оболочки – мукоцилиарном.

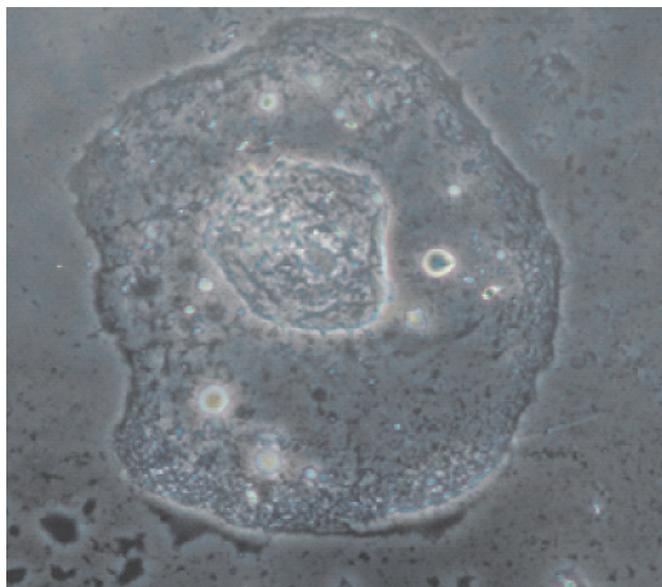


Рис. 1. Макрофаг пристеночной слизи ребёнка 1 года 2 месяцев. Фазово-контрастная микроскопия. Микрофото. Ув.х 400

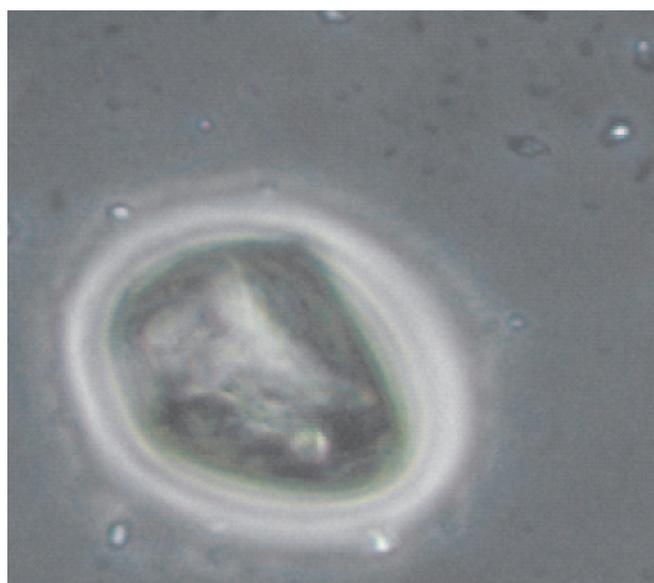
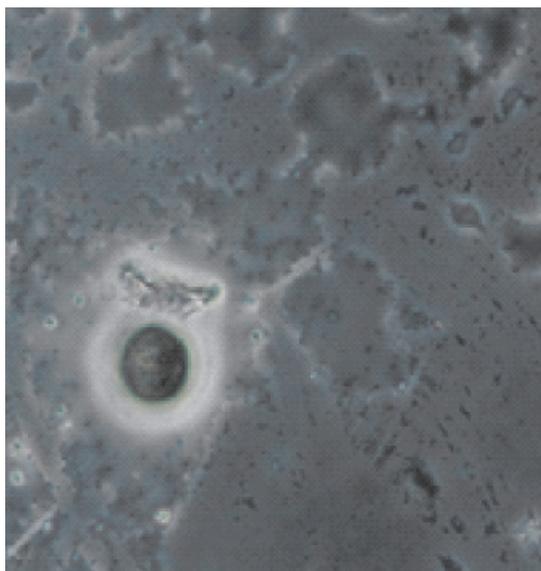
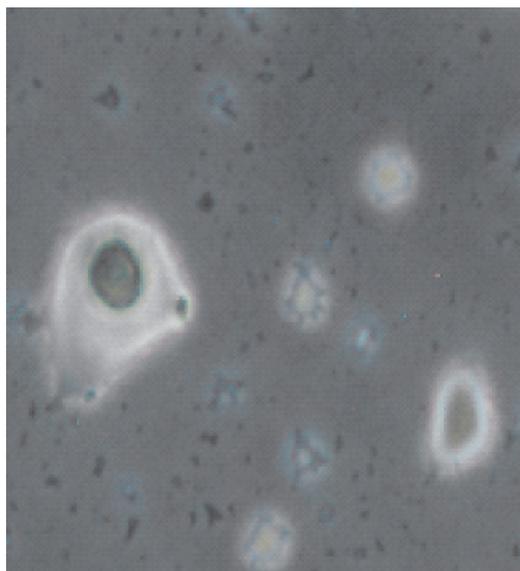


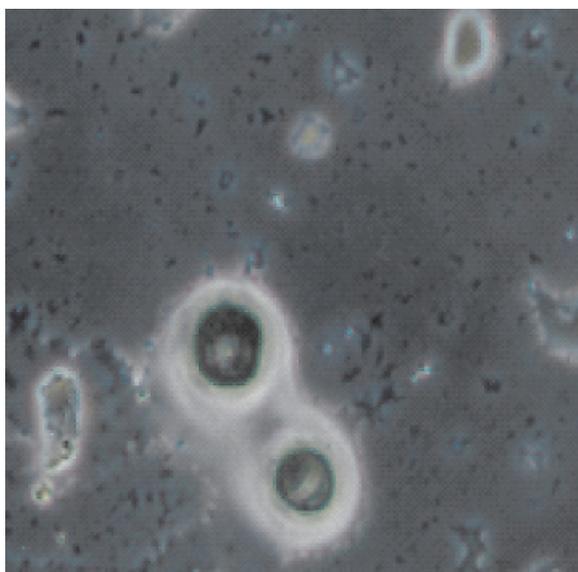
Рис. 2. Нейтрофил пристеночной слизи ребёнка 1 года 7 месяцев. Фазово-контрастная микроскопия. Микрофото. Ув.х 400



а



б



в

Рис. 3. Лимфоциты пристеночной слизи ребёнка 1 года 2 месяцев. Фазово-контрастная микроскопия. Микрофото. Ув. х 400

Дендритные клетки (рис. 4) достигали размеров 20×40 мкм, на поверхности имели выросты в количестве 5–7, ядро овальной формы с конденсированным гетерохроматином и многочисленные везикулы в цитоплазме. Наличие дендритных клеток в пристеночной слизи свидетельствует о том, что антигенпредставление происходит не на уровне внутриэпителиального барьера, а на его поверхности, в зоне действия первого звена иммунной защиты. В свете полученных данных возникает вопрос о дальнейшей миграции данных клеток и развитии последующих реакций иммунного ответа.

Известно, что в пределах эпителиального пласта и непосредственно под ним имеются как минимум две популяции клеток,

способные к презентации АГ. К их числу относятся АПК, лежащие у базальной мембраны (их аналогом в коже являются клетки Лангерганса), и клетки, осуществляющие транспорт неизмененного или процессированного АГ с поверхности эпителиального пласта (их аналогом в кишечнике являются так называемые М-клетки). По нашему мнению, к этой группе антигенпрезентирующих клеток следует отнести идентифицированные нами отростчатые клетки.

Особенно важным, на наш взгляд, является наличие в пристеночной слизи желудка слущенных конусовидных эпителиальных клеток, имеющих хорошо идентифицирующуюся выраженную складчатую поверхность в виде гофре, что позволяет причислить их к каёмчатому эпителию (рис. 5).

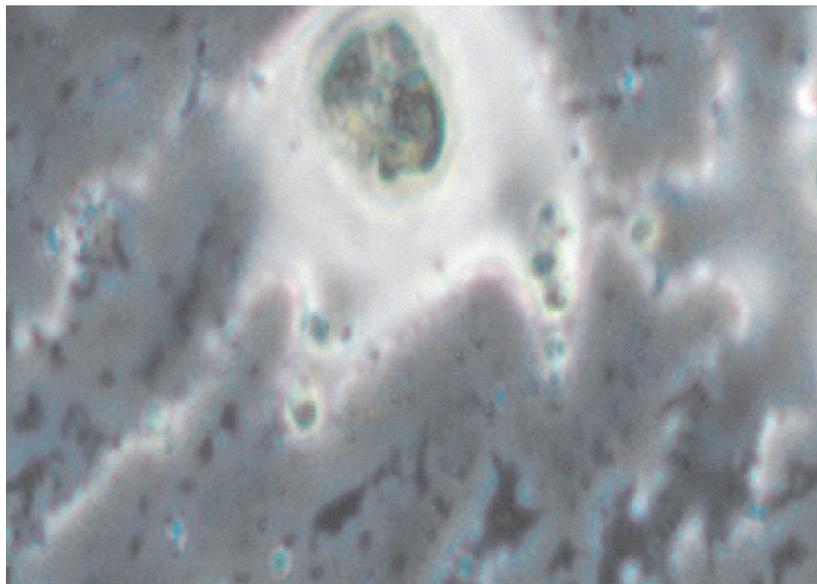


Рис. 4. Дендритная клетка пристеночной слизи ребёнка 1 года 2 месяцев. Фазово-контрастная микроскопия. Микрофото. Ув. x 800

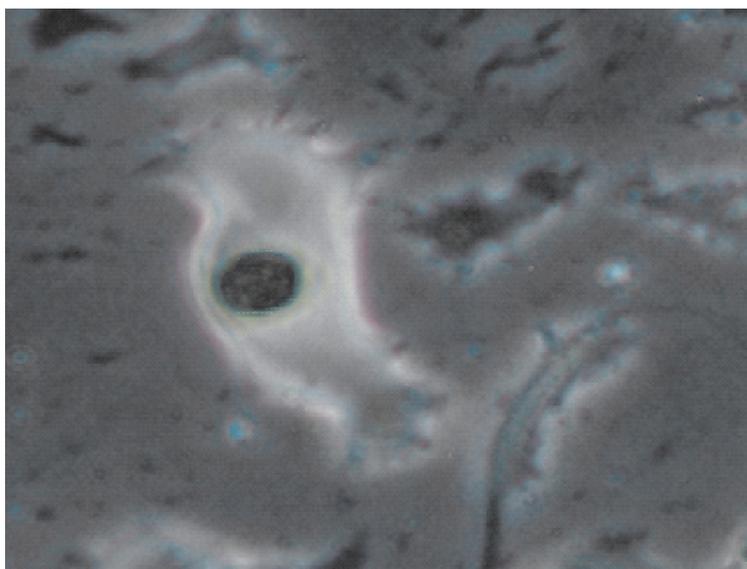


Рис. 5. Эпителиоцит пристеночной слизи ребёнка 1 года 2 месяцев. Фазово-контрастная микроскопия. Микрофото. Ув. x 800

Размеры клеток достигают 15 мкм в высоту и 4 мкм в основании. Апикальная часть расширена, может достигать до 6 мкм. Основание эпителиальных клеток имело закруглённую форму, характеризовалось содержанием многочисленных гранул, идентифицирующихся ниже центрально расположенного ядра. Возможно, что данная группа клеток участвует в процессе ферментации содержимого желудка, последующем всасывании гидролизатов и их транспортировке к базальной мембране. Отсутствие признаков процессов апоптоза (кариопикноза, фрагментации ядра, блеббинга) позволяет

предположить, что слущенные клетки не являются результатом физиологической регенерации эпителиального пласта, а десквамация этой группы эпителиоцитов происходит в результате альтеративных процессов. По нашему мнению, одной из причин десквамации эпителия может являться их участие в иммунных реакциях. Вероятно, способностью презентировать АГ обладают и обычные реснитчатые эпителиоциты, которые не являются профессиональными АПК, но под действием иммуномедиаторов (главным образом IFN-у) могут приобретать такую способность.

Известно, что дочерний эпителий, заменяющий отслоившийся в результате десквамации, не полностью дифференцирован. В нем очень мало или почти нет мукоида, поэтому он становится легкоуязвимым для соляной кислоты и пепсина, что препятствует полноценному функционированию и в дальнейшем заживлению дефекта.

Следует подчеркнуть, что эпителиоциты в настоящее время рассматриваются не только как барьерные, но и как иммунокомпетентные клетки. Известно, что в отсутствие повреждающих и стимулирующих воздействий эпителиоциты выполняют барьерную и секреторную функции и, как будто, ничем не напоминают иммунокомпетентные клетки. Но, тем не менее, уже в состоянии покоя они несут на своей поверхности рецепторы для цитокинов: ИФН, ИЛ 4, 17 и др., что является предпосылкой для вовлечения их в иммунные процессы. В условиях повреждения эпителиального барьера, воздействия микробов или их продуктов происходит активация эпителиальных клеток. Фактически активация происходит постоянно из-за присутствия на слизистых различных представителей мира микробов. При этом эпителиоциты приобретают свойства иммунокомпетентных клеток: начинают сами выделять цитокины, например, ИЛ 1, 6, ФНО, ИФН-гамма, по спектру, похожему на цитокины макрофагов и потому определяющие характер воспаления и участие эпителиоцитов в представлении антигенов лимфоидным клеткам. Также эпителиоциты выделяют гемопоэтины: ростовые факторы для нейтрофильных гранулоцитов, моноцитов, ИЛ 7, действующие и на сами эпителиальные клетки, а не только на гемопоэз. Установлена также выработка эпителиальными клетками ИЛ 12, 15, 16, 17, 18, секреция ими хемокинов, ответственных за привлечение в слизистые циркулирующих Т-лимфоцитов и других клеток [18, 19].

Состояние эпителия определяет качество иммунного местного ответа, характер и течение воспалительного процесса в слизистой при контакте с микроорганизмами. Но состояние эпителия определяется не только индукторами и ингибиторами пролиферации и их дифференцировки, но зависит и от скрытых инфекций, вызванных облигатными патогенами, от тех методов и лекарств, которые были использованы для их лечения. Поэтому особое внимание при диарее у детей на фоне вторичной гиполактазии должно быть уделено хеликобактерной инфекции [16].

В норме неподвижные эпителиоциты могут обратимо приобретать комплекс

признаков, характерный для активно и направленнодвигающихся клеток под воздействием клеточных факторов – цитокинов. Одним из них является «рассеивающий фактор» – SF, он же фактор роста гепатоцитов HGF. Рассеивающий фактор (SF) – это белок, секретируемый фибробластами, который вызывает разделение и рассеивание эпителиальных клеток. Под его воздействием разрушаются межклеточные контакты в эпителиальном пласте, эпителиоциты поляризуются и приобретают способность направленно двигаться.

Таким образом, пристеночная слизь в различных отделах желудка является составляющей не только гуморального иммунного ответа, но и клеточного. Мы считаем, что обнаруженные в пристеночной слизи различные отделов желудка свободные эпителиоциты являются следствием реакции эпителиального пласта на *H. pylori*.

Методом иммунной гистохимии в 95% биоптатов было установлено наличие *H. pylori* (рис. 6). При этом наблюдалось отсутствие контаминации микроорганизмов в эпителиоциты и в собственную пластинку слизистой оболочки, как это происходит в случае ЯБЖ у взрослых пациентов.

Нами отмечено, что микроорганизмы идентифицировались вблизи клеточной поверхности эпителиоцитов и в просвете желёз. Известно, что липополисахариды наружной мембраны *H. pylori* обладают свойством взаимодействовать с ламинином базальной мембраны эпителия желудка. Это разрывает его связь с интегрином, вследствие чего нарушается целостность эпителиального покрова – эпителиоциты утрачивают контакт с базальной мембраной и сливаются с образованием микродефектов на поверхности слизистой оболочки. Однако прямого действия *H. pylori* на эпителий недостаточно для его разрушения и образования дефекта.

Основные отклонения при инфекции НвР обнаруживаются в Т-клеточном вене иммунной системы. В инфильтрате слизистой оболочки желудка выявляется большее число Т-хелперов, чем у здоровых лиц и больных гастритом А и С. НвР-инвазия характеризуется гиперреактивностью ТН1-лимфоцитов, а активностью ТН2-клеток практически не изменяется. Доказано, что НвР взаимодействует с молекулами МНС на поверхности эпителиоцитов, запуская процесс апоптоза.

Увеличение интенсивности апоптической гибели клеток у взрослых пациентов приводит к развитию хронического поражения ЖКТ (гастрит, язва); может обуславливать метаплазию эпителия и инициировать опу-

холевый процесс. У наблюдаемых нами пациентов грудного и младенческого возраста процессы пролиферации настолько высоки, что вероятность формирования язв могла бы быть исключена, но, тем не менее, они имеются. Это является следствием того, что под влиянием НвР увеличивается синтез ФНО-а,

который угнетает клеточное деление, замедляет процессы регенерации тканей. Наряду с другими факторами наиболее существенное значение в стимуляции биосинтеза цитокинов макрофагами имеют продукты жизнедеятельности НвР. Доказано, что изменения местного иммунитета обратимы.

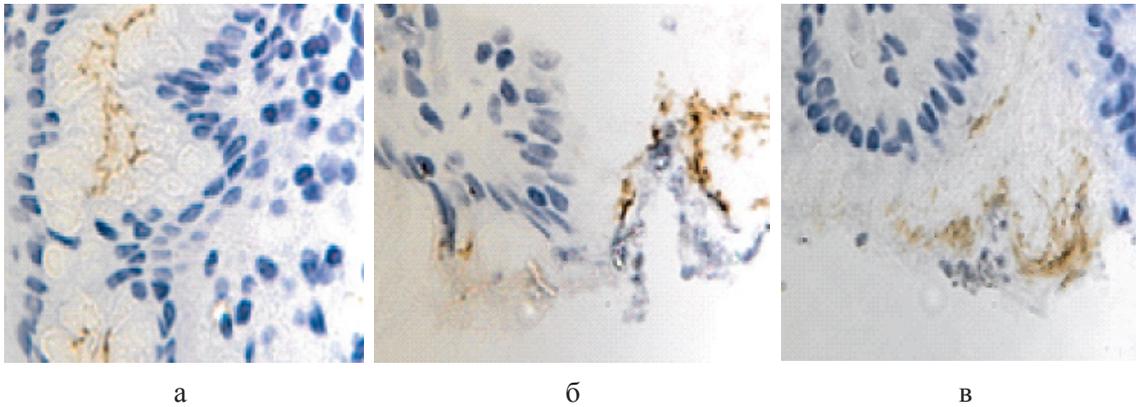


Рис. 6. Стенка желудка. НвР обсеменение. Иммуногистохимия. Микрофото. Ув. x800

Анализ срезов, полученных из биоптатов СОЖ, даёт дополнительное подтверждение альтеративных и репаративных процессов в слизистой оболочке, а также и изменений иммунного гомеостаза.

При гистологическом исследовании биоптатов слизистой оболочки желудка признаки воспалительной реакции обнаружены у всех больных. Изучение гастробиоптатов показало, что в 7 случаях лактазной недостаточности вовлечение в патологический процесс слизистой оболочки желудка характеризовалось развитием эозинофильного гастрита, сопровождающегося отеком и массивной эозинофильной инфильтрацией, особенно собственной пластинки, лимфангиоэктазиями. В период клинического улучшения болезни на фоне элиминационной диеты данные изменения купировались только у 1 ребенка. У 4 детей признаки эозинофильного гастрита сохранялись через 6 месяцев после купирования кислот диареи и нормализации копрограммы. Течение заболевания у данной категории больных характеризовалось рецидивирующим болевым синдромом, наличием эритематозных высыпаний на коже, плохими прибавками в массе тела. Неатрофический гастрит зарегистрировали у 2 больных, он характеризовался сочетанием лимфоцитарной и плазмоцитарной инфильтрации собственной пластинки слизистой оболочки антрального отдела и тела желудка с формированием лимфатических фолликулов и хеликобактерной обсемененностью.

Кроме этого, определялись изменения, характерные для первичного ответа на хеликобактериальную инфекцию – инфильтрация полиморфно-ядерными лейкоцитами. Под влиянием метаболитов реактивного кислорода и миелопероксидазы активированных лейкоцитов развиваются тяжелые деструктивные изменения эпителия и повреждаются эндотелии мелких сосудов, что нарушает микроциркуляцию и трофику стенки желудка.

Таким образом можно представить себе связь между *H. pylori* и гастральной дисфункцией [15]. При любом повреждении слизистой оболочки усиливается пролиферация эпителия. Нами установлено, что наличие *H. pylori* в острый период болезни у детей сопровождается повышенной пролиферативной активностью эпителиоцитов. При окрашивании гематоксилин-эозином это характеризуется выраженной базофилией и ростом ядерно-цитоплазматических отношений, что соответствует росту регенераторного потенциала. В зонах повреждения эпителиоцитов резко увеличивается количество делящихся клеток (рис. 7).

Наивысшая активность пролиферативных процессов регистрируется в дне желудочных желёз.

Методом определения белка гена Ki67, отражающем степень пролиферативной активности, было дополнительно подтверждено увеличение синтеза белка гена Ki67 в остром периоде заболевания и восстановление данных показателей при выздоровлении (рис. 8).

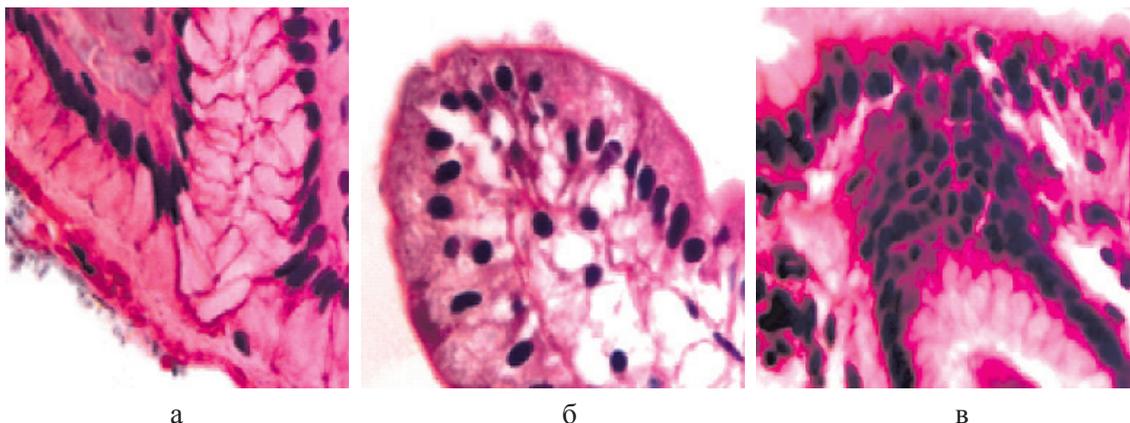


Рис. 7. Эпителиальная пластинка желудка детей с *H. pylori* инфицированием. Окраска г/э. Микрофото. Ув. x800

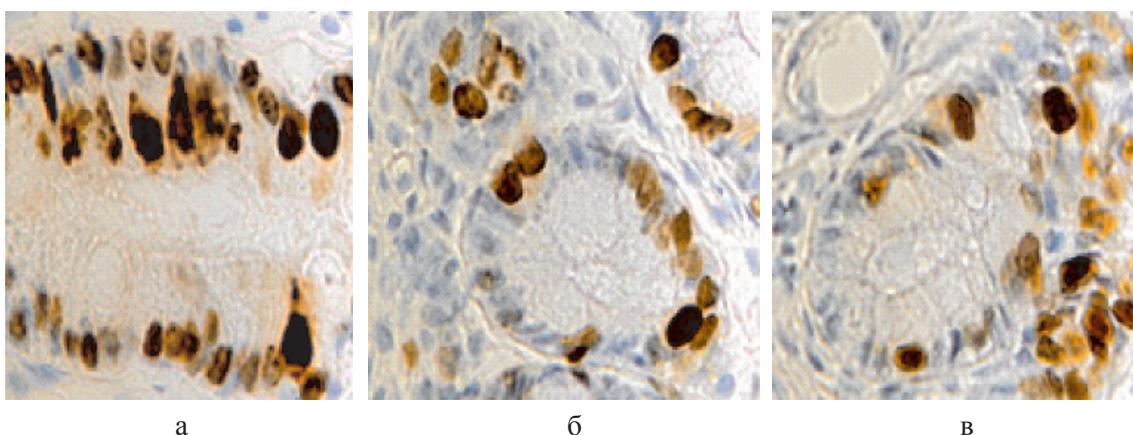


Рис. 8. Проллиферативная активность эпителиоцитов и клеток собственной пластинки слизистой оболочки желудка. Иммуногистохимия. Микрофото. Ув. x800

Нами отмечено повышение пролиферативной активности не только в эпителиальной пластинке, но и клеток собственной пластинки слизистой оболочки желудка.

Обнаружение в гастробиоптатах изменений по типу фовеолярной гиперплазии антрального отдела желудка с отеком и пролиферацией гладкомышечных клеток в собственной пластинке слизистой оболочки на фоне весьма умеренного воспаления в присутствии признаков хеликобактерной инфекции характеризовало реактивный рефлюкс-гастрит, который развился у 3 из 5 детей, имевших заброс желчи в желудок. Анализ локализации патологического процесса выявил, что изменения слизистой оболочки антрального отдела желудка у больных с лактазной недостаточностью встречались достоверно чаще. У больных с лактазной недостаточностью параллельно с исчезновением кислой диареи и нормализацией показателей метаболизма отмечалась положительная динамика со стороны слизистой оболочки желудка. Наиболее медленно восстанавливалась структура

слизистой оболочки у детей с признаками эозинофильного гастрита.

Кроме того, в зоне повышенной пролиферации отмечается недостаточное трофическое обеспечение, также способствующее пролонгированию существования участка десквамации. Это подтверждается тем, что большинство хронических язв локализуется на малой кривизне, где кровоснабжение слабее, чем в других отделах желудка. При сокращении мышц стенки желудка расположенные здесь артерии сдавливаются, что может вызывать локальную ишемию и некроз. Регенерация слизистой оболочки как физиологическая, так и репаративная обеспечивается соотношением новообразования клеток и их гибели, в первую очередь путем апоптоза. В экспериментальных исследованиях показано, что пролиферация в краях язв у взрослых пациентов увеличивается на 40%, а гибель клеток путем апоптоза – на 70% [7]. Это может рассматриваться как серьезная причина задержки репаративной регенерации и развития в последующем язвенного процесса. У детей

длительных мониторинговых исследований реакции эпителиальных пластов слизистых оболочек на хеликобактерные повреждающие воздействия не проводилось, поэтому аналогичные данные отсутствуют. Непосредственно *H. pylori* не может усиливать апоптоз, так как в краях десквамирующего участка (на регенерирующем эпителии) нет условий для его существования. Вероятно, главную роль в этом играют аммиак и ли-

пополисахариды бактерий [13]. При этом активируются Fas-рецепторы (CD95), которые называют «рецепторами смерти». После присоединения к этому рецептору специфического лиганда наступает гибель клетки.

Дополнительное подтверждение моноцитарной инфильтрации слизистой оболочки различных отделов желудка также получено с помощью иммунной гистохимии (рис. 9).

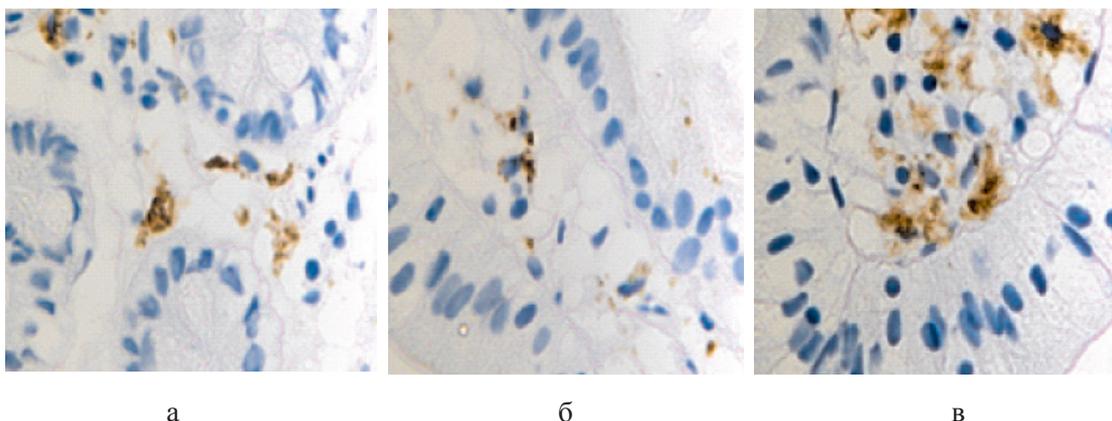


Рис. 9. Макрофаги CD163. Иммунная гистохимия. Микрофото. Ув.х 800. Идентифицируются только в соединительной ткани. Отсутствуют в просвете желёз и в эпителиальных пластинках

Установлено, что в процессе развития клинической симптоматики вторичной гиполактазии в сопровождении диареи количество мононуклеарных макрофагов, инфильтрирующих слизистую оболочку желудка, находится в зависимости от тяжести патологических проявлений болезни. Микроповреждение любой ткани может стать инициатором подобных реакций. В этом прослеживается один из универсальных механизмов гомеостаза – внутри популяции фагоцитов, в масштабе соединительной ткани, за ее пределами. С помощью иммунной гистохимии нами были выявлены ДК (рис. 10). ДК Лангерганса локализовались в базальном слое эпителиальной пластинки кардиального отдела желудка в количестве 2–3. Клеточные отростки были разветвленными и имели различное направление. Количество ДК в антральном и фундальном отделах желудка составляло 8–12 внутри эпителия. Характерной была их локализация в базальном слое эпителия в виде скоплений клеток, что свидетельствует об усиленной миграции ДК из эпителия и накоплении у базальной мембраны как у достаточно труднопреодолимого препятствия. В толще собственной пластинки слизистой оболочки желудка ДК было меньше, их отростки располагались в основном биполярно и были направлены к поверхности эпителия и к базальной мем-

бране, что свидетельствует об активации их передвижения. В собственной пластинке наблюдалось значительное увеличение количества ДК клеток по сравнению с нормой, отражающее их интенсивный приток. Отростки ДК ориентировались по ходу соединительно-тканых волокон, что также служит признаком движения. Установлена огромная роль в обеспечении презентации антигена иммунокомпетентным клеткам Лангерганса, составляющих от 3 до 5% клеточных популяций (до 800 клеток на 1 см). КЛ относятся к иммунокомпетентным клеткам, способным выполнять функцию макрофагов и служить микроокружением для Т-лимфоцитов, а также обеспечивать защитную роль Т-лимфоцитов против различных антигенов. Клетки Лангерганса довольно мобильны, что обеспечивает их встречу с антигеном. После встречи с антигеном они могут мигрировать в регионарные лимфоузлы и тормозить пролиферацию эпителиоцитов.

Клетки Лангерганса, лимфоциты, эпителиоциты постоянно взаимодействуют между собой. В частности, эпителиоциты после встречи с антигеном начинают продуцировать ИЛ-1, TNF, столь необходимые для активации клеток Лангерганса. В свою очередь, клетки Лангерганса, переходя в иммунную форму, секретируют ИЛ-1, ИЛ-6, воздействующие на Т-лимфоциты.

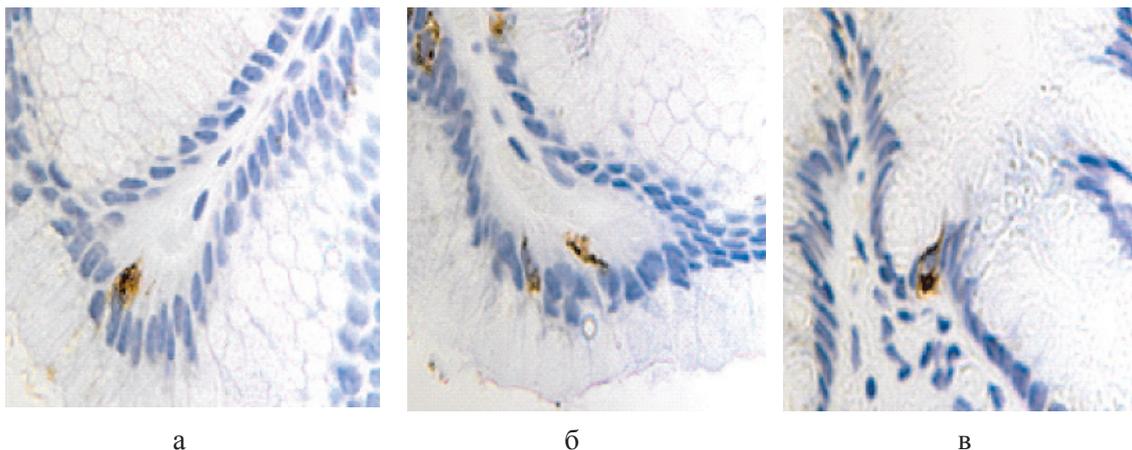


Рис. 10. Дендритные клетки CD68. Иммунная гистохимия. Микрофото. Ув. x 800. Идентифицируются в соединительной ткани, в слое эпителиоцитов и в просвете желёз, отростки и клетки выходят за пределы эпителиального пласта

Несмотря на то, что Т- и В-клетки довольно легко идентифицировать по поверхностным маркерам (Т3 или CD3 на Т-клетках и поверхностные Ig на В-клетках), следует иметь также представление о наиболее значимых дифференцировочных антигенах Т-лимфоцитов человека. Одними из важнейших являются CD4 и CD8 [20]. Выявленные нами CD4⁺-клетки при вторичной гиполактазии у детей внутри эпителия слизистой оболочки желудка являются единичными (рис. 11). В собственной пластинке CD4⁺ проявляют также слабую экспрессию. Проанализировав общее уменьшение количества CD4⁺-клеток в динамике гиполактазии, можно предположить сниже-

ние уровня их регуляторной функции. При контакте Т-лимфоцитов (Тi/h – индукторов хелперов) с антигенпрезентирующей клеткой CD4 выступает в роли специфического места связывания детерминант белковых молекул МНС класса II. Клетки CD4⁺ идентифицированы как индукторы супрессоров, что дает возможность косвенно определять также функционально активные индукторы хелперов. Отрицательная динамика количества CD4⁺ может свидетельствовать о том, что иммунные процессы далеки до нормализации, воспалительные реакции могут продолжаться и после купирования диареи и других проявлений вторичной гиполактазии.

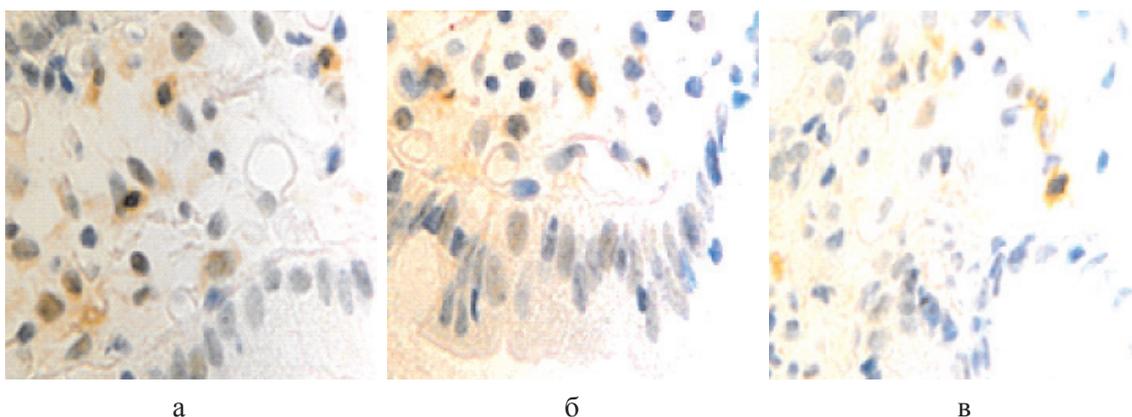


Рис. 11. CD 4⁺ клетки в слизистой оболочке желудка. Иммунная гистохимия. Микрофото. Ув. x 800

Сопоставляя количество макрофагов в стенке желудка у детей с гиполактазией, обильно инфильтрирующих слизистую оболочку и достигающих эпителиального слоя, и слабую экспрессию CD4⁺ лимфоцитов, можно сделать вывод о том, что разруше-

ние слизистой оболочки желудка происходит стремительно, так как зависит не только от НbР контаминации, но и от гипериммунизации собственной пластинки, при этом макрофаги фагоцитируют разрушающийся эпителий без достаточного контроля со

стороны CD4+лимфоцитов. С другой стороны, пролиферативные процессы, приводящие к закрытию дефектов эпителиального пласта, не способствуют регенерации с восстановлением барьерной и всасывательной функций эпителиоцитов. CD8 – антиген экспрессируется примерно на 1/3 периферических Т-клеток, созревающих из CD4+/CD8+-Т-лимфоцитов. Субпопуляция CD8+-Т-клеток включает цитотоксические и супрессорные Т-лимфоциты. Нами идентифицирован этот пул клеток в стенке желудка детей с вторичной гиполактазией (рис. 12). При контакте с клеткой-мишенью CD8 выступает в роли рецептора неополлимофных детерминант белков МНС класса I. В наших исследованиях клетки, имеющие маркер CD8+, идентифицируются не только в соединительной ткани, а также у базальной мембраны эпителиальной пластинки и внутри эпителиаль-

ного пласта. При этом CD8+-клетки располагались равномерно вдоль базального слоя и их насчитывали в антральном отделе до 40, в фундальном 15–20 клеток и кардиальном отделе до 7–11 клеток на 100 эпителиоцитов в остром периоде заболевания. CD8+-клетки окружали очаги вакуольной дистрофии. Этот факт объясняется, исходя из присущей CD8+ гамма-дельта-Т-лимфоцитам главной функции – удаления поврежденных эпителиоцитов, и характеризует их как линию защиты у входных ворот инфекции, которыми являются очаги десквамации и дистрофии эпителиального слоя. В собственной пластинке определяются скопления CD8+-клеток до 25–30 клеток на пике клинических проявлений и 10–12 в стадии снижения симптоматики, очевидно, они представляют собой прибывающие в патологически измененную ткань Т-лимфоцитов.

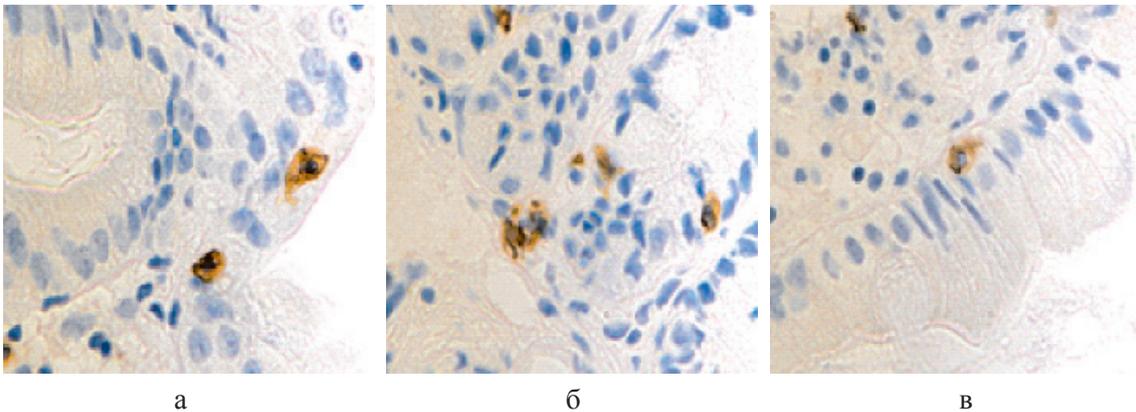


Рис. 12. CD 8+ клетки в слизистой оболочке желудка. Иммуногистохимия. Микрофото. Ув.х 800

Анализ изменения численности CD8+ и CD4+-клеток в эпителии показывает, что их количество находится в зависимости от стадии заболевания.

В наших исследованиях количество CD8+ лимфоцитов превышает количество CD4+ в несколько раз, при том, что в норме эти соотношения должны соответствовать 1:2.

Таким образом, при помощи иммуногистохимического метода исследования впервые проведена оценка локального иммунитета слизистой оболочки желудка при вторичной гиполактазии у детей. Полученные результаты показали усиление захвата антигенов дендритными клетками, о чем свидетельствует интенсивный приток ДК в слизистую оболочку, включение CD8+ Т-клеточного ответа на фоне снижения регулирующей хелперной функции, что проявляется в увеличении количества CD8+ клеток, их скоплении вокруг дефектов

эпителия и уменьшении количества CD4+-клеток в слизистой оболочке. В результате воздействия микробных факторов средней степени тяжести наблюдается иммунный ответ цитотоксического типа.

При изучении биоптатов желудка получены морфологические данные, свидетельствующие о большей частоте патологических изменений в период выраженных клинических проявлений болезни, т.е. при визуальном осмотре слизистой оболочки желудка имеется гиподиагностика частоты ее вовлечения в воспалительный процесс.

Гистологическое изучение слизистой оболочки у 2 больных на фоне клинических проявлений вторичной лактазной недостаточности специфических изменений структуры слизистой оболочки желудка не выявило. В это же время в эпителиальной пластинке слизистой оболочки желудка зарегистрировано увеличение клеточной

плотности за счет межэпителиальных лимфоцитов и плазматических клеток. Повторное изучение биоптатов в период нормализации процессов кишечного всасывания показало полное восстановление структуры эпителиального пласта.

Заключение

Полученные результаты позволяют считать, что для разработки патогенетически обоснованных протоколов терапии гиполактазии у детей грудного возраста необходимо учитывать состояние слизистой оболочки всего желудочно-кишечного тракта. Алгоритм стандартных диагностических мероприятий у данной категории больных должен включать эндоскопическое и гистологическое изучение слизистой оболочки пищевода, желудка, тонкой кишки. Особое внимание должно уделяться детям, у которых явления лактазной недостаточности сочетаются с признаками поражения кожи. Отсутствие клинического эффекта при реализации стандартного протокола лечебных мероприятий у детей грудного возраста, возможно, обусловлено явлениями аллергического (эозинофильного) гастрита.

Повреждение клеток слизистых оболочек ЖКТ и последующее развитие вторичной гиполактазии, сопровождающейся диареей, связано не столько с жизнедеятельностью НвР, сколько с индуцированной им аутоиммунной агрессией. Дальнейшие исследования ИС при инвазии НвР могут способствовать разработке методов избирательного влияния на иммунные процессы, снижению повреждения клеток ЖКТ, повышению качества лечения.

Список литературы

- Бехало В.А., Бондаренко В.М., Сысолятина Е.В. Характер взаимодействия бактерий комменсалов с факторами иммунитета при некоторых синдромах хронического воспаления кишечника // *Фарматека*. – 2009. – № 13. – С. 20–25.
- Бурков С.Г., Макух Е.А. Синдром раздражённого кишечника // *Фарматека*. – 2009. – № 8. – С. 60–64.
- Зершман Г.Б., Боксер В.О. Еюноскопия у детей // *Вопросы охраны материнства и детства*. – 1987. – Т. 32, № 7. – С. 20–24.
- Заблудский А.Н. Гастроинтестинальная эндоскопия у детей. – М.: Медицина, 2002. – 288 с.
- Ферментный спектр протеаз микрофлоры кишечника у недоношенных новорожденных с синдромом срыгивания и возможности его коррекции / А.В. Кузнецова, А.А. Бабинцева, О.Д. Зинкевич, О.Б. Бушуйкина // *Вопросы детской диетологии*. – 2006. – Т. 4, № 5. – С. 35–37.
- Синдром раздражённого кишечника. Клинические проявления и лечение / Е.Л. Наумова, В. Бурковская, Э. Белобородова, Е.С. Наумова, И. Куприянова, Л. Акимова // *Врач*. – 2009. – № 11. – С. 81–84.
- Оконенко Т.И., Оконенко Л.Б. Ассортимент и маркетинговые исследования лекарственных препаратов для лечения дисбактериоза кишечника // *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина*. – 2009. – № 4. – С. 52–57.
- Трембач Г.А., Коротько Г.Ф. Использование адаптивного биоуправления с обратной связью в лечении синдрома раздражённого кишечника // *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. – 2009. – № 1. – С. 67–71.
- Шептулин А.А., Кучумова С.Ю. Новое в изучении проблемы синдрома раздражённого кишечника (По материалам докладов 16-й Объединенной Европейской Недели Гастроэнтерологии; Вена, 2008) // *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. – 2009. – Т. 19, № 4. – С. 81–85.
- Шульпекова Ю.О., Баранская Е.К. Дифференциальная диагностика синдрома раздражённого кишечника и глютенной энтеропатии // *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. – 2009. – Т. 19, № 6. – С. 39–48.
- Antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* from patients in Ile-Ife, South-west, Nigeria / O.A. Aboderin, A.R. Abdu, B.W. Odetoyin, I.N. Okeke, O.O. Lawal, D.A. Ndububa, A.E. Agbakwuru, A. Lamikanra // *African Health Sciences*. – 2007. – Т. 7, № 3. – С. 143–147.
- Bishop P.R., Nowicki M.J., May W.L. Unsedated upper endoscopy in children // *Gastrointest. Endosc.* – 2002. – Vol. 55, № 6. – P. 624–630.
- Role of AmiA in the Morphological Transition of *Helicobacter pylori* and in Immune Escape / C. Chaput, C. Ecobichon, N. Cayet, S.E. Girardin, C. Werts, S. Guadagnini, M.C. Prévost, D. Mengin-Lecreulx, A. Labigne, I.G. Boneca // *PLoS Pathogens*. – 2006. – Т. 2, № 9. – С. 97.
- Bactericidal and Morphological Effects of NE-2001, a Novel Synthetic Agent Directed against *Helicobacter pylori* / G. Dai, N. Cheng, L. Dong, M. Muramatsu, S. Xiao, M.W. Wang, D.X. Zhu // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2005. – Т. 49, № 8. – С. 3468–3473.
- Holly M. Scott Algood, Timothy L. Cover *Helicobacter pylori* Persistence: an Overview of Interactions between *H. pylori* and Host Immune Defenses // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2006. – Т. 19, № 4. – С. 597–613.
- Glocker E., Stueger H.P., Kist M. Quinolone Resistance in *Helicobacter pylori* Isolates in Germany // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2007. – Т. 51, № 1. – С. 346–349.
- The Origins of Lactase Persistence in Europe / Y. Itan, A. Powell, M.A. Beaumont, J. Burger, M.G. Thomas // *Plos Computational Biology*. – 2009. – Vol. 5. – P. 13.
- In Vitro Activity of a Novel Antimicrobial Agent, TG44, for Treatment of *Helicobacter pylori* Infection / O. Kamoda, K. Anzai, J. Mizoguchi, M. Shiojiri, T. Yanagi, T. Nishino, S. Kamiya // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2006. – Т. 50, № 9. – С. 3062–3069.
- Lymphotoxin- β receptor-independent development of intestinal IL-22-producing NKp46+ innate lymphoid cells / N. Satoh-Takayama, S. Lesjean-Pottier, S. Sawa, C.A.J. Vosschenrich, G. Eberl, Di J.P. Santo // *Eur J Immunol.* – 2011 Apr. – №41(4). – P. 1075–85.
- Cell-to-cell interactions and signals involved in the reconstitution of peripheral CD8+ TCM and TEM cell pools / B. Zaragoza, C. Evaristo, A. Kissenpennig, V. Libri, B. Malissen, B. Rocha, A.A. Freitas, A.R.M. Almeida // *PLoS ONE* 6 : e17423. – 2011.

Рецензент –

Красников Ю.А., д.м.н., профессор ДВФУ ГОУ ВПО «Владивостокский государственный медицинский университет», г. Владивосток.

Работа поступила в редакцию 19.10.2011.