

УДК 616.348-002.44-091.8]-076(045)

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРОВ АПОПТОЗА И ПРОЛИФЕРАЦИИ У БОЛЬНЫХ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИМ ЯЗВЕННЫМ КОЛИТОМ

Маркова А.А., Кашкина Е.И., Рубцов В.С., Лякишева Р.В.

Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского, Саратов, e-mail: markova-ann@yandex.ru

Проведен анализ экспрессии маркеров апоптоза и пролиферации у 61 больного неспецифическим язвенным колитом в зависимости от длительности, степени тяжести заболевания, локализации воспалительного процесса в толстой кишке. Группу сравнения составили 15 практически здоровых человек. Обследование пациентов проводилось с использованием клинических, лабораторных, эндоскопических, морфологических методов. В биоптатах слизистой оболочки толстой кишки определяли экспрессию иммуногистохимических маркеров Ki-67, P53, BAX и PЭА. В процессе исследования выявлено статистически значимое снижение показателей пролиферативной активности слизистой оболочки толстой кишки у больных неспецифическим язвенным колитом по сравнению с группой здоровых лиц, а также снижение процессов пролиферации и повышение экспрессии маркеров апоптоза по мере увеличения длительности и усугубления тяжести клинических проявлений заболевания.

Ключевые слова: неспецифический язвенный колит, маркеры апоптоза и пролиферации

EXPRESSION FEATURES OF MARKERS OF APOPTOSIS AND PROLIFERATION IN PATIENTS WITH NONSPECIFIC ULCERATIVE COLITIS

Markova A.A., Kashkina E.I., Rubtsov V.S., Lyakisheva R.V.

Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky, Saratov, e-mail: markova-ann@yandex.ru

Analysis of the expression of markers of apoptosis and proliferation in 61 patients with nonspecific ulcerative colitis, depending on the duration, severity of the disease, localization of the inflammatory process was carried out. The comparison group consisted of 15 healthy people. The survey of patients was conducted with clinical, laboratory, endoscopic, morphological methods. In biopsy specimens from colonic mucosa the expression of immunohistochemical markers Ki-67, P53, BAX and CEA was determined. The study found a statistically significant decline in the proliferative activity of colonic mucosa in patients with ulcerative colitis when compared with healthy individuals, as well as reduced proliferation and increased apoptosis markers expression with increasing duration and severity exacerbation of clinical manifestations of disease.

Keywords: nonspecific ulcerative colitis, markers of apoptosis and proliferation

Неспецифический язвенный колит (НЯК) является одним из наиболее тяжелых заболеваний желудочно-кишечного тракта, приводящим к инвалидности и смерти пациентов [2].

В последние десятилетия в различных странах мира отмечается рост заболеваемости НЯК, что, в значительной мере, связано с улучшением диагностики этого патологического процесса.

В настоящее время в диагностике НЯК используется комплексный подход с применением рентгенологического, эндоскопического, гистологического методов исследования. Одним из перспективных способов оценки состояния слизистой оболочки толстой кишки является иммуногистохимия с определением маркеров пролиферации и апоптоза [2].

Среди методов иммуногистохимического исследования наиболее широкое применение нашли маркеры апоптоза bcl и p53 [1]. Известно, что белки семейства bcl относятся или к индукторам апоптоза (Bad, Bax, Bak и др.) или к ингибиторам апоптоза (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-1 и др.) [8]. Следует отметить, что белок p53 выявляется во многих

трансформированных клетках. Его функции направлены на предупреждение переноса поврежденной генетической информации от одного поколения клеток другому, в том числе за счет инициации апоптоза. Высокое содержание p53 приводит к повышению концентрации в клетке Bax и уменьшению концентрации bcl-2, что способствует гибели клетки путем апоптоза [1].

В качестве маркеров пролиферации используются несколько антигенов. Ядерный антиген пролиферирующих клеток (Proliferating Cell Nuclear Antigen) (PCNA) участвует не только в пролиферации клеток, но и в репарации ДНК после ее повреждения [3], что делает данный антиген условно специфичным к клеточному циклу, так как восстановление ДНК может осуществляться в фазе покоя [1]. Другим антигеном, достоверно ассоциированным с фазами клеточного цикла, является Ki-67. Экспрессия этого белка наступает во время пресинтетической фазы, нарастает в течение клеточного цикла и резко уменьшается в фазе митоза [4]. Этот белок, в отличие от PCNA, не участвует в репарации ДНК [7]. Экспрессия Ki-67 дает возможность идентифицировать

клетки, находящиеся во всех фазах клеточного цикла, кроме фазы покоя [5,6].

Цель исследования – провести анализ экспрессии маркеров апоптоза и пролиферации у больных неспецифическим язвенным колитом в зависимости от длительности, степени тяжести заболевания, локализации воспалительного процесса.

Материалы и методы исследования

Основную группу составил 61 пациент с НЯК в возрасте от 19 до 66 лет (27 женщин и 34 мужчины),

$$I \text{ Ki-67\%} = \frac{X (\text{количество ядер иммунопозитивных к Ki-67})}{X_1 (\text{общее количество ядер})} \cdot 100,$$

где X – количество ядер в поле зрения микроскопа. Подсчет производился не менее чем в 10 полях зрения.

Об апоптозе судили по экспрессии белков p53 и VAX в поверхностном и железистом эпителии толстой кишки. Для оценки регенеративных процессов в слизистой оболочке толстой кишки при НЯК определялась экспрессия ракового эмбрионального антигена (РЭА).

Результаты исследования и их обсуждение

При иммуногистохимическом исследовании определялась зависимость экспрессии указанных маркеров от длительности НЯК, тяжести его клинических проявлений

Индекс пролиферации Ki-67 клеток эпителия слизистой оболочки толстой кишки (%) у здоровых людей и больных неспецифическим язвенным колитом в зависимости от его длительности, тяжести течения и локализации

Анализируемые группы	n	Значения Ki-67	Достоверность различий
Группа сравнения	15	54(46;67)	
Длительность заболевания			
• < 1 года	17	31(25;36)	$p_0 \leq 0,001$ $p_0 \leq 0,001$ $p_1 \leq 0,02$ $p_0 \leq 0,001$ $p_1 \geq 0,05$
• 1–5 лет	24	39(34;45)	
• > 5 лет	20	35(27;38)	
Тяжесть течения			
• легкое	15	38(35;47)	$p_0 \leq 0,004$ $p_0 \leq 0,004$ $p_2 \leq 0,05$ $p_0 \leq 0,004$ $p_2 \leq 0,02$
• средне-тяжелое	39	34(27;40)	
• тяжелое	7	30(27;33)	
Локализация поражения			
• дистальный	20	35(30;46)	$p_0 \leq 0,002$ $p_0 \leq 0,002$ $p_3 \geq 0,05$ $p_0 \leq 0,002$ $p_3 \geq 0,05$
• левосторонний	28	33(25;40)	
• тотальный	13	35(33;36)	

Примечания:

- p_0 – достоверность различий с группой контроля;
- p_1 – достоверность различий с длительностью заболевания менее 1 года;
- p_2 – достоверность различий с легким течением заболевания;
- p_3 – достоверность различий с дистальной локализацией заболевания.

Экспрессия VAX у здоровых лиц отсутствовала в 80% случаев, а в 20% отмечалась низкая экспрессия маркера. Экспрессия РЭА отмечалась в 50% случаев и также была низкой.

группу сравнения – 15 практически здоровых людей. Обследование пациентов проводилось с использованием клинических, лабораторных, эндоскопических, морфологических методов, а также с помощью иммуногистохимического исследования биоптатов слизистой оболочки толстой кишки.

Пациенты с НЯК были разделены на группы в зависимости от степени тяжести клинических проявлений, длительности заболевания, локализации воспалительного процесса.

Пролиферативную активность клеток определяли по пролиферативному показателю Ki-67 по формуле:

и распространенности воспалительного процесса в толстой кишке.

При статистической обработке полученных данных после проведения тестов на равенство дисперсий и нормальность распределения было доказано, что выборка не соответствует закону нормального распределения, поэтому для сравнения групп применялись непараметрические критерии. Для описания количественных признаков использовались медиана, верхний и нижний квартили.

Так, у здоровых лиц ИП Ki-67 составил 54 (46;67), что говорит о высокой пролиферативной активности клеток толстой кишки (таблица).

Как следует из таблицы, повышение ИП Ki-67 в группе больных с длительностью заболевания от 1 года до 5 лет по сравнению с 1 группой ($p \leq 0,02$), можно объяснить повышенной пролиферативной активностью клеток, отражающей репаративные процессы в слизистой оболочке толстой кишки. Низкий ИП Ki-67 в группе пациентов с язвенным колитом длительностью до 1 года, составляющий 31(25;36), может свидетельствовать о выраженном снижении пролиферативных процессов в слизистой оболочке кишки в дебюте заболевания.

При исследовании показателя p53 в зависимости от длительности заболевания, закономерности экспрессии этого белка не выявлено, однако имеется различие в экспрессии этого маркера между группой здоровых лиц и группой больных с длительностью заболевания от 1 года до 5 лет ($p \leq 0,05$) и более 5 лет ($p \leq 0,03$).

Экспрессия VAX определялась как в поверхностном, так и железистом эпителии толстой кишки. Было установлено, что экспрессия данного маркера в поверхностном эпителии и в эпителии желез практически одинакова в каждом отдельном случае. Экспрессию VAX у больных НЯК выявляли в 100% случаев, статистически значимые различия в экспрессии маркера были выявлены между группой сравнения и больными НЯК ($p \leq 0,01$).

При сравнении интенсивности экспрессии РЭА отмечалось значительное ее повышение при увеличении длительности заболевания. В группе сравнения экспрессия РЭА проявлялась лишь в единичных случаях ($p \leq 0,003$).

В зависимости от тяжести клинических проявлений НЯК также было выявлено изменение ИП Ki-67 (см. таблицу). ИП Ki-67 уменьшался у больных со среднетяжелой формой заболевания ($p \leq 0,05$) и тяжелой формой ($p \leq 0,02$) по сравнению с пациентами с легким течением, также имелось различие между группой здоровых лиц и пациентами с НЯК любой степени тяжести ($p \leq 0,004$).

Изменение экспрессии маркера p53 зависело от тяжести течения обострения (12,5% при легком течении; 35,7% при средней степени тяжести и 50% при тяжелом). Статистически значимые различия получены между группами здоровых лиц и пациентов с НЯК средней и тяжелой формами заболевания ($p \leq 0,03$).

VAX и РЭА экспрессировали в 100% случаев, однако, зависимости интенсивно-

сти экспрессии данных маркеров от степени тяжести клинических проявлений НЯК не выявлено. Установлены различия в экспрессии маркеров между группой сравнения и пациентами с НЯК независимо от тяжести клинических проявлений ($p \leq 0,01$).

При анализе зависимости ИП Ki-67 от локализации воспалительного процесса было выявлено значительное повышение экспрессии маркера в группе больных НЯК по сравнению со здоровыми людьми ($p \leq 0,002$), однако при сравнительном анализе внутри основной группы статистически значимых различий между экспрессией маркера и различной локализацией процесса не получено ($p \geq 0,05$).

Экспрессия p53 выявлялась не у всех пациентов. У больных с дистальным колитом положительный результат был получен только в 20% случаев, с левосторонним у 18% больных. При тотальном поражении кишечника экспрессия p53 обнаруживалась в 100% случаев ($p \leq 0,03$ по сравнению с дистальным колитом). Следует отметить, что экспрессия была наиболее интенсивна в участках с признаками метаплазии эпителия.

Интенсивность экспрессии VAX в группе с тотальным колитом была значительно выше, чем при дистальном колите ($p \leq 0,03$).

Экспрессия РЭА не зависела от локализации воспалительного процесса, однако она была достоверно выше у больных НЯК по сравнению с группой сравнения ($p \leq 0,03$).

Выводы

1. При неспецифическом язвенном колите пролиферативная активность клеток эпителия слизистой оболочки толстой кишки значительно ниже, а показатели апоптоза выше, чем при отсутствии ее воспалительных изменений.

2. Увеличение длительности неспецифического язвенного колита сопровождается низкой пролиферативной активностью эпителия слизистой оболочки толстой кишки, что может ухудшать ее репарацию.

3. С нарастанием тяжести клинических проявлений неспецифического язвенного колита отмечается не только уменьшение степени пролиферативной активности клеток эпителия толстой кишки, но и увеличение показателей активации апоптоза.

4. При распространении воспалительного процесса на проксимальные отделы толстой кишки выявлено увеличение показателей апоптоза.

Список литературы

1. Аруин Л.И., Капуллер Л.Л., Исаков В.А. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника. – М.: Триада-Х, 1998. – 496 с.

2. 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.

3. Brown D., Gatter K. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology // *Histopathology*. – 1990. – № 17. – P. 489–501

4. Bruno S., Darynkiewich Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells // *Cell. Prolif.* – 1992. – № 25. – P. 31–40.

5. 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.

6. Holt P.R., Moss S.F., Kapetanakis A.M. Is Ki-67 a better proliferative marker in the colon than proliferating cell nuclear antigen? *Cancer. Epidemiol. Prev.* – 1997. – № 6. – P. 131–135.

7. McCormick D., Chong C., Hobbs C. et al. Detection of the Ki-67 antigen in fixed and wax- embedded section with the monoclonal antibody MIB-1 // *Histopathology*. – 1993. – № 22. – P. 355–360.

8. Reed J. C. Bcl-2 and regulation of programmed cell death // *J. Cell. Biol.* – 1994. – Vol. 124. – P. 1–6.

References

1. Aruin L.I., Kapuller L.L., Isakov V.A. *Morfologicheskaja diagnostika boleznej zheludka i kishechnika*. M.: Triada-H, 1998, – 496 s.

2. *Gastrojenterologija i gepatologija: diagnostika i lechenie: rukovodstvo dlja vrachej/pod red. A.V. Kalinina*,

A.F. Loginova, A.I. Hazanova. 2-e izd., pererab. i dop. M.: MEDpress-inform, 2011. 864 s.: il.

3. Brown D., Gatter K. *Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology*. – *Histopathology*. 1990. № 17. P. 489–501.

4. Bruno S., Darynkiewich Z. *Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells*. – *Cell.Prolif.* 1992. № 25. P. 31-40.

5. Bromley M., Rew D., Becciolini A. Et al. *A comparison of proliferation markers (BrdUrd, Ki-67, PCNA) determined at each cell position in the crypts of normal human colonic mucosa*. *Eur. – J. Histochem.* 1996. Vol. 40, P. 89-100.

6. Holt P.R., Moss S.F., Kapetanakis A.M. *Is Ki-67 a better proliferative marker in the colon than proliferating cell nuclear antigen?* *Cancer. Epidemiol. – Biomarkers. Prev.* 1997. № 6. P. 131-135.

7. McCormick D., Chong C., Hobbs C. et al. *Detection of the Ki-67 antigen in fixed and wax- embedded section with the monoclonal antibody MIB-1* – *Histopathology*. 1993. № 22. P. 355-360.

8. Reed J. C. *Bcl-2 and regulation of programmed cell death*. – *J. Cell. Biol.* 1994. Vol. 124, P. 1-6.

Рецензенты:

Шварц Ю.Г., д.м.н., профессор, зав. кафедрой факультетской терапии ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ имени В.И. Разумовского» Минздравсоцразвития России, г. Саратов;

Федорина Т.А., д.м.н., профессор, зав. кафедрой общей и клинической патологии: патологическая анатомия, патологическая физиология ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития России, г. Самара.

Работа поступила в редакцию 09.12.2011.