

УДК 615.835:611.018.25/621:616.62-002

## ВЛИЯНИЕ ОЗОНОТЕРАПИИ НА СТРУКТУРНУЮ РЕОРГАНИЗАЦИЮ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ЦИСТИТЕ

**Неймарк А.И., Лушникова Е.Л., Молодых О.П., Бакарев М.А., Сизов К.А.,  
Лапий Г.А., Колдышева Е.В., Абдуллаев Н.А., Непомнящих Л.М.**  
*ФГБУ НИИ региональной патологии и патоморфологии СО РАМН, Новосибирск,  
e-mail: pathol@soramn.ru*

Изучены особенности структурной реорганизации слизистой оболочки мочевого пузыря при хроническом цистите и его коррекции методами озонотерапии. Фенотип слизистой оболочки при хроническом цистите определяется сочетанием деструктивных и компенсаторно-приспособительных реакций. Выявлена взаимосвязь между различными перестройками эпителиального пласта (дистрофия, метаплазия, атрофия), уровнем клеточной пролиферации (по экспрессии Ki-67) и ультраструктурной организацией уротелиоцитов. Установлено, что положительная динамика структурных изменений наиболее выражена при использовании в лечебном комплексе внутривезикулярной озонотерапии и в меньшей степени парентеральной озонотерапии, что проявляется в ослаблении признаков воспаления и альтерации при одновременном усилении репаративных реакций слизистой оболочки. Наблюдается редукция явлений дистрофии и десквамации уротелия, уменьшение воспалительноклеточной инфильтрации, приобретение ею мононуклеарного характера. Выявлено достоверное повышение индекса пролиферации уротелиоцитов, признаки лимфангио- и неоангиогенеза, почти трехкратное увеличение относительной площади микрососудов собственной пластинки. Отмечено, что при всех методах терапии регресс патоморфологических изменений слизистой оболочки мочевого пузыря по окончании 10-дневного курса лечения носит незавершенный характер.

**Ключевые слова:** хронический цистит, озонотерапия, клеточная пролиферация, морфология, ультраструктура

## EFFECT OF OZONE THERAPY ON THE STRUCTURAL REORGANIZATION OF BLADDER MUCOSA IN CHRONIC CYSTITIS

**Neymark A.I., Lushnikova E.L., Molodykh O.P., Bakarev M.A., Sizov K.A.,  
Lapii G.A., Koldysheva E.V., Abdullayev N.A., Nepomnyashchikh L.M.**  
*Research Institute of Regional Pathology and Pathomorphology SD RAMS,  
Novosibirsk, e-mail: pathol@soramn.ru*

Bladder mucosa structural reorganization and its modulations by ozone therapy were studied in patients with chronic cystitis. The mucosal phenotype in chronic cystitis was determined by a combination of destructive, compensatory and adaptive reactions. Correlations were found between structural modifications (dystrophy, metaplasia, and atrophy), cell proliferation indices (assessed by Ki-67 expression) and ultrastructural changes of urothelium. The use of intravesical and, to a lesser degree, parenteral ozone therapy in treatment protocols was associated with the most prominent positive dynamics of mucosal rearrangements resulting in attenuation of inflammation and simultaneous induction of reparative reactions. The signs of urothelial dystrophy and desquamation were markedly reduced, as was inflammatory infiltration, which took on mononuclear character. These processes were paralleled by significant increase in urothelium proliferation indices and almost 3-fold expansion of the relative area occupied by lamina propria microvessels with signs of lymphangiogenesis and neoangiogenesis. It is noteworthy that, regardless of treatment modality, the regress of pathomorphological changes in bladder mucosa following the 10-day course of therapy was incomplete.

**Keywords:** chronic cystitis, ozone therapy, cell proliferation, morphology, ultrastructure

Хронический цистит относится к сложным проблемам современной урологии. Наиболее часто он встречается у женщин молодого и среднего возраста, характеризуется длительным упорным течением и может приводить к продолжительной и повторной нетрудоспособности [4]. Несмотря на повышенный интерес исследователей к этой патологии, результаты лечения хронического цистита часто остаются неудовлетворительными. Сложность заключается в полиэтиологической природе заболевания и множественности факторов, поддерживающих течение патологического процесса в стенке мочевого пузыря.

В настоящее время, несмотря на важную роль инфекционного фактора, суще-

ственное значение в возникновении и развитии хронического цистита придается расстройствам кровообращения в области треугольника и шейки мочевого пузыря, что является следствием сопутствующих заболеваний, гормонального дисбаланса и повышения тонуса симпатической нервной системы [3, 6]. При этом ухудшение биоэнергетики и спазм детрузора в условиях ишемии может приводить к нарушению уродинамики с повышением давления в полости органа, прогрессированию тканевой гипоксии и увеличению проницаемости уротелия [2].

Ключевые аспекты пато- и морфогенеза хронического цистита, несмотря на значительный объем проводимых исследований,

остаются во многом неясными. Особенно это касается специфики регионарной микроциркуляции, характера тканевых и клеточных изменений слизистой оболочки. Все это препятствует формированию рациональной лечебной стратегии, одним из важных направлений которой является регрессия структурных и функциональных нарушений, ассоциированных с персистенцией патологического процесса в мочевом пузыре.

В этом аспекте перспективным представляется метод озонотерапии, активное использование которой в последние годы обусловлено разнообразием клинических эффектов, что установлено при ряде заболеваний. В частности, показано, что интравезикальное применение озонированных кристаллоидов оказывает санирующее и противовоспалительное воздействие [1, 8]. Положительные эффекты парентеральной озонотерапии, реализующиеся в улучшении микроциркуляции, нормализации иммунного статуса и оксидантно-антиоксидантных процессов, по-видимому, связаны с умеренным контролируемым оксидативным стрессом – индуктором важных физиологических реакций [9].

**Цель данного исследования** – изучить патоморфологические характеристики слизистой оболочки мочевого пузыря при хроническом цистите и в условиях его коррекции методами озонотерапии.

#### **Материал и методы исследования**

Обследовано 65 женщин в возрасте от 20 до 75 лет (средний возраст  $44,9 \pm 1,9$  лет) с хроническим циститом и явлениями стойкой дизурии. Согласно проводимым видам лечения, все наблюдения были разделены на три группы со сравнимой возрастной структурой, длительностью заболевания и клинико-эндоскопической картиной. Курс базисной терапии у пациенток всех групп включал антибактериальные, противовоспалительные и антигистаминные препараты, витаминные группы В и С, магнитотерапию на область мочевого пузыря. В I-й группе наблюдений (20 пациенток) наряду с базисной терапией проводили инстилляцию в мочевой пузырь многокомпонентных растворов (чередование S. Novocaini 0,25% 50,0 с Lin. synthomycini 5,0 и S. Novocaini 0,25% 50,0, S. Dimexidi 4,0, S. Dimedroli 1% 2,0, S. Analgini 50% 4,0). Во II-й группе (30 пациенток) базисная терапия сочеталась с внутривезикальными инстилляциями озонированного физиологического раствора в концентрации 2000–4000 мкг/л. В III-й группе (15 пациенток) вместе с базисной терапией выполняли парентеральные инъекции озонированного физиологического раствора в концентрации 1000 мкг/л. Барботирование 0,9% раствора хлорида натрия до достижения требуемой концентрации осуществляли на установке «Медозонс БМ» (Россия).

Комплексное исследование включало определение общеклинических и лабораторных показателей, проведение урофлоуметрии, цистоманометрии,

лазерной доплеровской флоуметрии, цистоскопии в сочетании с биопсией слизистой оболочки мочевого пузыря.

Биоптаты изучали методами световой и электронной микроскопии, морфометрического и иммуногистохимического анализа. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином в сочетании с реакцией Перлса, по ван Гизону, ставили PAS-реакцию. Полутонкие срезы окрашивали азуром II и ставили PAS-реакцию с докраской азуром II. При морфометрии препаратов оценивали толщину уротелия, площадь кровеносных сосудов в собственной пластинке слизистой оболочки (в процентах к общей площади). Светооптическое исследование и морфометрический анализ проводили в универсальном микроскопе «Leica DM 4000B» (Германия). Микрофотографии получали с использованием цифровой фотокамеры «Leica DFC 320» (Германия) и компьютерной программы «Leica QWin V3».

Ультратонкие срезы контрастировали в насыщенном растворе уранилацетата и цитрате свинца, исследовали в электронном микроскопе JEM1400 (фирмы «Jeol», Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Фотографирование осуществляли с помощью цифровой камеры Veleta и программного обеспечения iTEM (Olympus, Япония, Германия).

В качестве интегрального показателя процессов пролиферации уротелия рассматривали процент меченых Ki-67 клеток. Проводили непрямым двухшаговое иммуногистохимическое окрашивание с применением коммерческого набора фирмы Spring Bioscience (USA). Результаты иммуногистохимической реакции оценивали путем подсчета количества меченых ядер на 1000 клеток.

При статистической обработке результатов в случаях нормального распределения, для сравнения средних величин применяли t-критерий Стьюдента. В случаях несоответствия нормальному распределению и при неравенстве дисперсий использовали непараметрические U-критерии Манна–Уитни (для независимых выборок) и T-критерий Вилкоксона (для связанных выборок).

#### **Результаты исследования и их обсуждение**

При хроническом цистите в биоптатах мочевого пузыря выявлены значительные нарушения рельефа слизистой оболочки, дистрофические изменения и участки атрофии уротелия, которые чередовались с очагами его гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии. Дистрофически измененные поверхностные клетки подвергались частичной десквамации, наблюдался внутриэпителиальный диапедез лимфоцитов и нейтрофилов. Эрозивные изменения слизистой оболочки сопровождалась выраженным фиброзированием стромы, нарушениями гемодинамики, атипичной васкуляризацией в виде ангиоматоза кровеносных сосудов, клеточной инфильтрацией как макрофагально-лимфоцитарной природы, так и с включением нейтрофилов. В зонах атрофии пласт уротелия состоял из 1–2 рядов клеток, толщина его не превышала 30 мкм.

В отдельных биоптатах выявлялись признаки железистой метаплазии уротелия.

В слизистой оболочке из области треугольника Льео обнаружены многочисленные гнезда Брунна. Участки умеренной плоскоклеточной метаплазии уротелия толщиной 121–200 мкм сочетались с локусами выраженной гиперплазии и очагами многослойного ороговевающего эпителия с явлениями паракератоза, в которых толщина эпителиального пласта достигала 360 мкм. На поверхности и внутри слоя плоских клеток встречались крупные пузыри, содержащие элементы крови с обилием лейкоцитов.

Гетерогенность уротелия находила свое отражение в неоднородном характере его пролиферативной активности. В зонах атрофии и небольших участках железистой метаплазии пролиферативная активность уротелия практически полностью отсутствовала. В очагах гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии индекс пролиферации (по экспрессии Ki-67) достигал высоких значений, составляя в среднем  $19,0 \pm 2,6\%$ .

В I-й группе наблюдений через 13–14 дней по окончании курса базисной терапии с внутривезикулярными инстилляциями многокомпонентных растворов отмечено восстановление общего плана строения слизистой оболочки мочевого пузыря при сохранении очаговых и диффузных воспалительных элементов и дистрофически-атрофических изменений уротелия. Обращали на себя внимание участки компенсаторной гиперплазии уротелия, где число клеточных рядов достигало 10, толщина пласта колебалась от 40 до 70 мкм. В очагах плоскоклеточной метаплазии (преимущественно в области треугольника Льео) толщина уротелия достигала 220 мкм. В участках гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии пролиферативная активность уротелиоцитов имела тенденцию к увеличению по сравнению с показателями до лечения ( $21,1 \pm 2,4\%$ ).

Субэпителиальная клеточная инфильтрация уменьшалась незначительно и сохраняла полиморфный характер с относительно большим содержанием нейтрофилов. Разрешение воспалительного процесса сопровождалось образованием в строме грубых фиброзных прослоек. Наблюдались признаки выраженного лимфангиогенеза. Площадь кровеносных сосудов собственной пластинки составляла  $3,9 \pm 0,9\%$ .

Во II-й группе пациенток после проведенного курса базисной терапии в сочетании с внутривезикулярной озонотерапией в биоптатах мочевого пузыря слой переходного эпителия равномерно выстилал поверхность слизистой оболочки, зоны

десквамации были единичными. Толщина эпителиального пласта колебалась от 30 до 130 мкм, отмечалось увеличение пролиферативной активности уротелия. Индекс пролиферации (по экспрессии Ki-67) достигал  $28,5 \pm 2,8\%$ , что достоверно превышало соответствующие значения до лечения и в I-й группе наблюдений. Признаки дисплазии отсутствовали.

В строме выявлялись участки неоангиогенеза, признаки капиллярного полнокровия, дилатация венул. Относительная площадь сосудов собственной пластинки составила  $10,6 \pm 1,3\%$ , что почти в три раза превышало соответствующий показатель в группе с базисной терапией. Диффузно-очаговая клеточная инфильтрация собственной пластинки уменьшалась, при этом в ряде случаев отмечалась значительная концентрация нейтрофилов в сосудах, расположенных в очагах лимфоцитарной инфильтрации. Фиброзные изменения слизистой оболочки носили умеренный, иногда выраженный характер.

В наблюдениях III-й группы на 13–14 сутки после базисного лечения в сочетании с парентеральной озонотерапией эпителиальная выстилка слизистой оболочки мочевого пузыря в значительной степени восстанавливалась. Толщина уротелия (до 7 рядов клеток) в среднем была несколько меньшей, чем во II-й группе, и составила 40–90 мкм. Сохранялись очаги плоскоклеточной метаплазии и выраженной гиперплазии, преимущественно в области мочевого пузыря, с утолщением эпителиального пласта до 220 мкм. Существенно (но в меньшей степени по сравнению со II-й группой) увеличилась пролиферативная активность уротелиоцитов (индекс пролиферации  $24,3 \pm 2,2\%$ ), а также миофибробластов и макрофагов собственной пластинки слизистой оболочки. Субэпителиальная клеточная инфильтрация преимущественно носила лимфоцитарный характер.

В результате электронно-микроскопического исследования установлено, что ультраструктурные особенности уротелия при хроническом цистите стереотипны и определяются локализацией клеток в зонах атрофии, плоскоклеточной метаплазии или дистрофии, а также выраженностью и распространенностью этих изменений.

Для биоптатов, взятых до лечения и после базисной терапии (I-я группа), характерна наиболее выраженная гетерогенность. В участках сохранения общего строения переходного эпителия клетки, имеющие нормальную ультраструктуру, чередовались со значительно измененными уротелиоци-

тами с признаками фокальной и тотальной альтерации. В эпителиальном пласте имелись группы клеток с крупными электронно-прозрачными вакуолями и липидными везикулами. Определенное число эпителиоцитов, практически лишенных микроворсинок, отличались электронно-плотной цитоплазмой, в которой плохо различимы цитоплазматические органеллы.

При атрофии переходного эпителия преобладали уротелиоциты кубической или несколько уплощенной формы, гетерогенность которых была обусловлена различиями электронной плотности ядер и цитоплазматического матрикса. Для них характерны уменьшение числа митохондрий и белоксинтезирующих органелл, нередко – изменения ядрышек (лизис, коллапс или сегрегация). В наибольшей степени полиморфны эпителиоциты базального и промежуточного клеточных слоев, сохранившиеся покровные («зонтичные») клетки уплощены и иногда вакуолизированы.

В участках плоскоклеточной метаплазии среди поверхностных и промежуточных клеток визуализировалось обилие специализированных контактов типа десмосом и гемидесмосом. Многие уротелиоциты характеризовались полигональной или вытянутой формой с многочисленными отростками плазмолеммы, массивными отложениями гликогена в цитоплазме, значительной вакуолизацией цитоплазматической сети, деструкцией крист митохондрий, множественными полиморфными фагосомами. Плоский эпителий отличался минимальным содержанием мембранных цитоплазматических органелл и большим количеством тонофиламентов, участвующих в формировании десмосом. На протяжении эпителиального пласта в связи с отеком наблюдалось локальное расширение интерцеллюлярных пространств.

В биоптатах II-й и III-й групп наблюдений (после внутривезикулярной и парентеральной озонотерапии) значительная часть клеток эпителиального пласта восстанавливала нормальную ультраструктурную организацию. Отдельные измененные уротелиоциты отличались признаками фокальной альтерации, на что указывало нарушение регулярного расположения микроворсинок, фокальная дезорганизация и деструкция цитоплазматических органелл, начинающаяся с расширения и вакуолизации цитоплазматической сети.

Таким образом, к основным факторам, определяющим фенотип структурной реорганизации слизистой оболочки мочевого пузыря при хроническом цистите, отно-

сятся состояние уротелия, выраженность и состав воспалительноклеточной инфильтрации, степень фиброобразования собственной пластинки. Сочетание деструктивных и компенсаторно-приспособительных реакций находит свое отражение в гетерогенности структуры эпителиального пласта – чередовании дистрофических и атрофических изменений, участков гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии.

Необходимо отметить, что в норме уротелий представляет собой относительно стабильную ткань с индексом пролиферации (по экспрессии Ki-67) порядка 1% [7, 10]. Резкое увеличение пролиферативной активности уротелиоцитов в биоптатах II-й и в меньшей степени III-й группы наблюдений, при отсутствии морфологических признаков клеточной атипичности и дисплазии указывает на возможную роль озонотерапии в интенсификации репаративных процессов в слизистой оболочке мочевого пузыря.

Вместе с элементами собственной пластинки слизистой оболочки уротелий образует единую барьерную и сигнальную систему [5], одним из определяющих компонентов которой является субэпителиальное микроциркуляторное русло. Нарушения микроциркуляции могут быть одним из факторов, способствующих поддержанию хронического патологического процесса в стенке мочевого пузыря [2, 3]. Признаки лимфангио- и неоангиогенеза, наиболее выраженные после внутривезикулярной озонотерапии в совокупности с почти трехкратным увеличением относительной площади сосудов собственной пластинки можно рассматривать в аспекте компенсаторно-приспособительных реакций, направленных на улучшение дренирования слизистой оболочки в условиях хронического воспаления.

В целом структурная реорганизация слизистой оболочки мочевого пузыря при коррекции хронического цистита проявляется в уменьшении признаков воспаления и альтерации (редукция явлений дистрофии и десквамации уротелия, снижение интенсивности клеточной инфильтрации и приобретение ею моноклеарного характера) при одновременном усилении репаративных процессов (повышение пролиферации уротелия, улучшение гемодинамики, восстановление внутриклеточной организации уротелиоцитов). Регресс патоморфологических изменений независимо от способов коррекции носит незавершенный характер и наиболее выражен при использовании в комплексе лечения методов внутривезикулярной и в меньшей степени парентеральной озонотерапии.

## Список литературы

1. Озонотерапия в урологии / В.В. Кузьменко, А.И. Неймарк, А.В. Кузьменко, Б.А. Неймарк. – Воронеж, 2009. – 508 с.
2. Неймарк А.И., Клыжина Е.А., Неймарк Б.А. Влияние различных видов консервативного лечения на уродинамику и микроциркуляцию у женщин с гиперактивным мочевым пузырем // Урология. – 2006. – № 6. – С. 65–70.
3. Гипербарическая оксигенация в комплексном лечении интерстициального цистита / Д.Ю. Пушкарь, А.В. Зайцев, А.П. Гавриленко, А.Б. Мацаев, Г.Р. Касян, К.Б. Колонтарев, Р.Ф. Фарманов // Урология. – 2010. – № 1. – С. 22–24.
4. Скрябин Г.Н., Александров В.П., Кореньков Д.Г., Назаров Т.Н. Циститы. – СПб., 2006. – 127 с.
5. Birder L.A. Urothelial Signaling // Andersson K.E., Michel M.C. (eds) Urinary tract. Handbook of Experimental Pharmacology 202. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2011. – P. 207–231.
6. Birder L.A., Hanna-Mitchell A.T., Mayer E., Buffington C.A. Cystitis, Co-morbid Disorders and Associated Epithelial Dysfunction // NeuroUrol. Urodyn. – 2011. – Vol. 30, № 5. – P. 668–672.
7. Cina S.J., Lancaster-Weiss K.J., Lecksell K., Epstein J.I. Correlation of Ki-67 and p53 with the new World Health Organization/International Society of Urological Pathology classification system for urothelial neoplasia // Arch. Pathol. Lab. Med. – 2001. – Vol. 125. – P. 646–651.
8. Clavo B., Gutierrez D., Martín D., Suarez G., Hernandez M.A., Robaina F. Intravesical ozone therapy for progressive radiation-induced hematuria // J. Altern. Complement. Med. – 2005. – Vol. 11, № 3. – P. 539–541.
9. Sagai M., Bocci V. Mechanisms of action involved in ozone therapy: Is healing induced via a mild oxidative stress? // Med. Gas Res. – 2011. – doi:10.1186/2045-9912-1-29.
10. Shie J.-H., Kuo H.-C. Higher levels of cell apoptosis and abnormal E-cadherin expression in the urothelium are associated with inflammation in patients with interstitial cystitis/painful bladder syndrome // BJU Int. – 2010. – Vol. 108. – P. E136–E141.
2. Neymark A.I., Klyzhina Ye.A., Neymark B.A. *Urologiya*. 2006. no 6. pp. 65–70.
3. Pushkar D.Yu., Zaitsev A.V., Gavrilenko A.P., Matsayev A.B., Kasyan G.R., Kolontaryov K.B., Farmanov R.F. *Urologiya*. 2010. no 1. pp. 22–24.
4. Skryabin G.N., Aleksandrov V.P., Korenkov D.G., Nazarov T.N. *Cistity*. St. Petersburg, 2006. 127 p.
5. Birder L.A. *Urothelial Signaling*. In: Andersson K.E., Michel M.C. (eds) Urinary tract. Handbook of Experimental Pharmacology 202. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2011. pp. 207–231.
6. Birder L.A., Hanna-Mitchell A.T., Mayer E., Buffington C.A. *NeuroUrol. Urodyn*. 2011. Vol. 30, no 5. pp. 668–672.
7. Cina S.J., Lancaster-Weiss K.J., Lecksell K., Epstein J.I. *Arch. Pathol. Lab. Med*. 2001. Vol. 125. pp. 646–651.
8. Clavo B., Gutierrez D., Martín D., Suarez G., Hernandez M.A., Robaina F. *J. Altern. Complement. Med*. 2005. Vol. 11, no 3. pp. 539–541.
9. Sagai M., Bocci V. *Med. Gas Res*. 2011. doi:10.1186/2045-9912-1-29.
10. Shie J.-H., Kuo H.-C. *BJU Int*. 2010. Vol. 108. pp. E136–E141.

## References

1. Kuzmenko V.V., Neymark A.I., Kuzmenko A.V., Neymark B.A. *Ozonoterapiya v urologiyi*. Voronezh, 2009. 508 p.

## Рецензенты:

Горчаков В.Н., д.м.н., профессор, зав. лабораторией функциональной морфологии, ФГБУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии» Сибирского отделения РАМН, г. Новосибирск;

Поляков Л.М., д.м.н., профессор, зав. лабораторией медицинской биотехнологии и зам. директора по научной работе, ФГБУ «Научно-исследовательский институт биохимии» Сибирского отделения РАМН, г. Новосибирск.

Работа поступила в редакцию 06.03.2013.