

УДК 611.77:612.42:616

РЕГУЛЯЦИЯ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ЭПИТЕЛИЕВ

^{1,2}Рева И.В., ¹Рева Г.В., ²Ямамото Т., ¹Можилевская Е.С., ¹Даниленко М.В.,
¹Новиков А.С., ¹Толмачёв В.Е., ¹Калинин О.Б., ¹Перерва О.В., ¹Маломан Н.В.,
¹Гирия О.В., ¹Разумов П.А., ¹Грахова Н.В.

¹Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, e-mail: RevaGal@yandex.ru;

²Международный Медицинский Научный и Образовательный Центр, Ниигата, Япония,
e-mail: avers2@yandex.ru

Изучена пролиферативная активность покровных эпителиоцитов слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта, органов дыхания, выделительной системы, эпидермиса кожи, роговицы глаза. Установлено, что при физиологической регенерации эпителиальных пластинок в регуляции пролиферативной активности эпителиоцитов принимают участие эффекторные иммуноциты CD4, CD8, CD68, CD163, CD204, которые являются не только источниками факторов роста, но и осуществляют контроль за удалением повреждённых клеток. Выявлена динамика количества иммуноцитов как в возрастном аспекте, так и при репаративной регенерации на фоне микробной контаминации различной этиологии, при повреждении в результате термотравмы, а также при малигнизации. Представлены особенности репаративной регенерации покровных эпителиальных пластов слизистых оболочек различных систем органов человека и эпидермиса кожи в зависимости от локализации. Проведён количественный анализ иммуноцитов эпителиальных пластинок в зависимости от генома инфекционных патогенов. Установлена роль иммуноцитов в запуске апоптоза и малигнизации кератиноцитов.

Ключевые слова: канцерогенез, папилломавирус, HPV, концепции онкогенеза, иммуноциты, стволовые клетки, дендритные клетки, клетки Лангерганса, антигенпредставление, Hb pylori, апоптоз, кожа, слизистые оболочки, ожог, репаративная регенерация

REGULATION OF PROLIFERATIVE ACTIVITY OF EPITHELIAL CELLS

^{1,2}Reva I.V., ¹Reva G.V., ²Yamamoto T., ¹Mojilevskaya E.S., ¹Danilenko M.V.,
¹Novikov A.S., ¹Tolmachev V.E., ¹Kalinin O.B., ¹Pererva O.V., ¹Maloman N.V.,
¹Girya O.V., ¹Razumov P.A., ¹Grachova N.V.

¹Far Eastern Federal University, Vladivostok, e-mail: RevaGal@yandex.ru;

²International Medical Research Center (IMERC), Niigata, Japan, e-mail: avers2@yandex.ru

Investigated proliferative activity of integumentary epithelial cells mucous membranes of the gastrointestinal, respiratory, excretory system, the epidermis of the skin, cornea of the eye. It is established that the physiological regeneration of epithelial proliferative activity in the regulation of epithelial cells involved effector CD4, CD8 immunocyt, CD68, CD163, CD204, which are not only sources of growth factors, and exercise control over the disposal of damaged cells. Dynamics of immune cells in the age aspect and reparative regeneration in microbial contamination of different etiology, damaged as a result of burns, and malignancy. The features of reparative regeneration of epithelial layers of the mucosal surface of the various systems of organs and epidermis the skin depending on the location. A quantitative analysis of the immune cells of epithelial plates depending on the genome of infectious pathogens. It was showed role of immune cells in triggering apoptosis and malignancy of keratinocytes.

Keywords: carcinogenesis, papillomavirus, HPV, concepts of carcinogenesis, immunocytes, stem cells, dendritic cells, Langerhans cells, antigen preventatives cells, Hb pylori, apoptosis, the skin, the mucous membranes, burn, reparative regeneration

Покровные эпителиальные пласты различных систем органов человека подвергаются высокой антигенной нагрузке [11]. В первую очередь вредным влияниям подвергаются кератиноциты, и от их функциональной лабильности зависит уровень резистентности организма к повреждающим агентам [3]. Тем не менее в настоящее время практически отсутствуют данные об изменениях клеточного состава эпителиальных пластов эпидермиса кожи и слизистых оболочек не только в условиях репаративной регенерации, но также и при физиологической регенерации [1, 9]. Данные о возрастных особенностях иммунного гомеостаза и барьерных свойствах покровных эпителиев, несмотря на

многочисленные исследования, пока не являются достаточными, чтобы управлять процессами заживления ткани с восстановлением её функции [5, 13]. Образование грубых и даже келоидных рубцов, сопровождающих гиперрегенерацию, трофических язв, образующихся на фоне гипорегенерации, свидетельствует о том, что изучение механизмов регенерации и контроля за этим процессом клеток иммунофагоцитарного звена, обеспечивающего наряду с кератиноцитами барьерные свойства покровных эпителиев, на современном этапе является одним из наиболее актуальных вопросов в современной хирургии, косметологии, гастроэнтерологии, онкологии [2, 6].

Цель исследования – совершенствование диагностики, лечения и прогнозирование исходов повреждений покровных эпителиев на основе анализа локального иммунного гомеостаза при микробной контаминации, термотравме, малигнизации.

Материал и методы исследования

Исследование было проведено с учётом положений Хельсинской декларации (2000) и с разрешением этического комитета ФГАОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет». Материалом послужили биоптаты кожи, слизистых оболочек ЖКТ, включая слизистую оболочку полости рта, органов дыхания, включая слизистую оболочку гайморовой пазухи, выделительной системы, а также слизистой оболочки шейки матки, взятые у пациентов по клиническим показаниям во время лечебных мероприятий.

Основным методом морфологического исследования явилось иммуногистохимическое фенотипирование на основе кластеров дифференцировки (Cluster of Differentiation – CD) предшественников дендритных клеток (CD11⁺/CD303⁺), клеток Лангерганса (CD68⁺), интерстициальных макрофагов (CD163⁺), тучных клеток (CD204⁺), Т-лимфоцитов (CD4⁺/CD8⁺). Интенсивность пролиферативных процессов в эпителиальной пластинке оценивалась по митотическому индексу посредством маркера Ki-67: количество митозов на 100 клеток. Иммуноморфологическое исследование проводили в лаборатории патоморфологии университета г. Ниигата (Япония).

Кроме того, при анализе биопсий использовались рутинные методики (окраски гематоксилином и эозином, по Ван-Гизону, по Браше и альциановым синим), серебрение – для определения активности ядрышкового организатора рибосом, фазовоконтрастная и электронная микроскопия. В дополнение к биопсийному анализировался и цитологический материал – мазки-отпечатки слизистых оболочек различных систем органов.

Изучение гистологических срезов и мазков-отпечатков осуществлялось с помощью микроскопа Olympus BX52 с оригинальным программным обеспечением для морфометрии.

Статистическая обработка полученных данных, проверка статистической значимости различий между группами по параметрам распределения и сравнение групп выборок проведено с применением методов вариационной статистики, параметрических и непараметрических методов корреляционного анализа.

Результаты исследования и их обсуждение

Проведенные нами исследования по изучению закономерностей распределения эффекторных клеток CD68 в коже человека в условиях репаративной регенерации кожи после ожоговой травмы показали, что идентификация АПК CD68 происходит, как и в здоровой коже, только в эпидермисе [9]. В коже человека при термотравме сохраняется общая закономерность распределения иммуноцитов CD68, но количество клеток CD68 в эпидермисе кожи с термотравмой выше, чем в условиях физиологической

регенерации ($p < 0,01$). Это может свидетельствовать о том, что миграция CD68 при репаративной регенерации в структуре кожи при ожогах подчиняется тем же механизмам, что и при физиологической, но в условиях повреждения кожи возникает повышенный запрос ткани на миграцию макрофагов для фагоцитоза некротизирующихся микроорганизмов [10].

При HPV инфекции эпидермис и дерма подвергаются гипертрофии, появляются папилломатозные разрастания, эпидермис и прилежащий сосочковый слой инфильтрируются лейкоцитарным пулом клеток, как и в исследованиях других авторов [14]. Установлено, что при папилломавирусной инфекции одним из ключевых моментов в дисгенезе и нарушениях нормального хода регенерации эпидермальных пластов и дермы кожи может быть извращение антигенпрезентации и нарушений в дальнейшем иммунных клеточных взаимодействий [5]. При физиологическом старении снижается миграционная активность клеток CD68 в ответ на воздействие ФНО-а, на их поверхности уменьшается число молекул адгезии, продуктов генов главного комплекса гистосовместимости II класса и стимулирующих молекул, а продуцируемый кератиноцитами 1L-10 дополнительно угнетает антигенпрезентирующие функции дендритных клеток. Клинически это сочетается с подавлением контактной гиперчувствительности у пожилых лиц и снижением защитных реакций в ответ на контаминацию HPV [8]. Нарушение хода физиологической регенерации и появление участков гипертрофии связано с тропностью HPV к камбиальным клеткам эпидермиса, нарушением функции антигенпрезентации CD68, их расположением в подлежащей эпителию соединительной ткани на фоне снижения количества, а затем полного их отсутствия в эпителиальных пластах, что может свидетельствовать о нарушении антигенпредставления в структурах кожи человека и последующем снижении контроля за физиологической и репаративной регенерацией в целом, запуску процесса адаптивной гипертрофии в структурах кожи для сохранения барьерных свойств эпителия [12]. Высокая скорость пролиферации развивается на фоне несоответствия дифференцировки и специализации клеток дифферона кератиноцитов, хронической инфильтрации лейкоцитами соединительной ткани и нарушения вследствие гибели кератиноцитов в системе взаимодействия эффекторных иммуноцитов, а также апоптозу дифферона кератиноцитов эпидермиса [4] (таблица).

Показатели иммунного гомеостаза кожи человека в норме и при патологии

Состояние кожи	Кол-во клеток в поле зрения (М ± m)					МИ
	CD163 ⁺	CD11 ⁺ /303 ⁺	CD68 ⁺	CD204 ⁺	CD4 ⁺ /8 ⁺	
Контроль	2,60 ± 0,48	2,45 ± 0,14	2,98 ± 0,11	3,67 ± 0,17	2,44 ± 0,12	6,75 ± 0,24
Папилломавирусная инфекция	1,80 ± 0,07	1,20 ± 0,16	1,40 ± 0,04	1,70 ± 0,09	1,30 ± 0,04	5,79 ± 0,20
Пигментный невус	1,50 ± 0,30	0,90 ± 0,01	0,70 ± 0,15	1,40 ± 0,03	0,80 ± 0,02	5,18 ± 0,08
Ожоги	1,60 ± 0,50	1,00 ± 0,06	1,20 ± 0,43	1,60 ± 0,20	1,00 ± 0,05	5,51 ± 0,17

Проведенный однофакторный корреляционный анализ с использованием двусторонних тестов по методу Пирсона выявил прямую сильную корреляционную связь между митотическим индексом эпителиоцитов эпидермиса и количеством макрофагов ($r = 0,8$), обратную слабую корреляцию с возрастом пациентов ($r = -0,3$), и прямую сильную корреляционную зависимость – с количеством клеток Лангерганса и тучных клеток ($r = 0,7$).

Анализ сравнительных данных последствий альтерации НрР слизистой оболочки желудка и морфологические проявления длительной контаминации НрV в коже человека позволили установить, что длительная альтерация эпителиальных пластов приводит к истощению собственного камбиального эпителия, пролиферативная активность которого для сохранения барьерных свойств эпителиального пласта увеличивается под контролем эффекторных иммуноцитов [2]. Хроническое воспаление приводит к истощению регенераторного потенциала эпителия, которое компенсируется вначале увеличением количества макрофагов [7]. Для уничтожения апоптозирующих клеток и повреждённых возрастает количество антигенпрезентирующих эффекторов, перемещающихся из эпителиальных пластов в соединительную ткань.

Работа выполнена при поддержке Научного Фонда ДВФУ и Международного гранта ДВФУ (соглашение № 13-09-0602-м_а от «б» ноября 2013 г.).

Список литературы

1. Akita S., Akino K., Hirano A. Basic Fibroblast Growth Factor in Scarless Wound Healing // *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2013 Mar;2(2):44–49.
2. Almeida S., Ryser S., Obarzanek-Fojt M., Hohl D., Huber M. The TRAF-interacting protein (TRIP) is a regula-

tor of keratinocyte proliferation // *J Invest Dermatol*. 2011 Feb;131(2):349–57.

3. Aragona M., Panciera T., Manfrin A., Giulitti S., Michielin F., Elvassore N., Dupont S., Piccolo S. A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors // *Cell*. 2013 Aug 29;154(5):1047–59.

4. Calvo K.L., Ronco M.T., Noguera N.I., Garcia F. Benzimidazole modulates cell proliferation in acute leukemia cells // *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2013 Aug;35(4):478–86.

5. Camicia R., Bachmann S.B., Winkler H.C., Beer M., Tinguely M., Haralambieva E., Hassa P.O. BAL1/ARTD9 represses the anti-proliferative and pro-apoptotic IFN γ -STAT1-IRF1-p53 axis in diffuse large B-cell lymphoma // *J Cell Sci*. 2013 May 1;126(Pt 9):1969–80.

6. Hirobe T., Terunuma E. Reduced proliferative and differentiative activity of mouse pink-eyed dilution melanoblasts is related to apoptosis // *Zoolog Sci*. 2012 Nov;29(11):725–32.

7. Gao J.L., Lv G.Y., He B.C., Zhang B.Q., Zhang H., Wang N., Wang C.Z., Du W., Yuan C.S., He T.C. Ginseng saponin metabolite 20(S)-protopanaxadiol inhibits tumor growth by targeting multiple cancer signaling pathways // *Oncol Rep*. 2013 Jul;30(1):292–8.

8. Ershov V.A., Chirskii V.S., Viazovaia A.A., Narvskaja O.V., Lisianskaia A.S. Activity of proliferative and apoptotic processes in the integration of human papillomavirus type 16 DNA into the cervical epithelium // *Arkh Patol*. 2013 Mar-Apr;75(2):16–9.

9. Kurabi A., Pak K., Dang X., Coimbra R., Eliceiri B.P., Ryan A.F., Baird A. Ecrq4 attenuates the inflammatory proliferative response of mucosal epithelial cells to infection // *PLoS One*. 2013 Apr 23;8(4):e61394.

10. Laptev M.V., Nikulin N.K. A mathematical model of paracrine regulation of the proliferative activity of epidermis with the participation of T-lymphocytes // *Biofizika*. 2010 Mar-Apr;55(2):361–74.

11. Samuels T.L., Pearson A.C., Wells C.W., Stoner G.D., Johnston N. Curcumin and anthocyanin inhibit pepsin-mediated cell damage and carcinogenic changes in airway epithelial cells // *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2013 Oct;122(10):632–41.

12. Shi H.L., Wu X.J., Liu Y., Xie J.Q. Berberine counteracts enhanced IL-8 expression of AGS cells induced by evodiamine // *Life Sci*. 2013 Nov 19;93(22):830–9.

13. Yuan Y., Zhang J., Cai L., Ding C., Wang X., Chen H., Wang X., Yan J., Lu J. Leptin induces cell proliferation and reduces cell apoptosis by activating c-myc in cervical cancer // *Oncol Rep*. 2013 Jun;29(6):2291–6.

14. Wang H., Sun Y., Liu S., Yu H., Li W., Zeng J., Chen C., Jia J. Upregulation of progranulin by *Helicobacter pylori* in human gastric epithelial cells via p38MAPK and MEK1/2 signal-

ing pathway: role in epithelial cell proliferation and migration // *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2011 Oct;63(1):82–92.

References

1. Akita S., Akino K., Hirano A. Basic Fibroblast Growth Factor in Scarless Wound Healing // *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2013 Mar;2(2):44–49.
2. Almeida S., Ryser S., Obarzanek-Fojt M., Hohl D., Huber M. The TRAF-interacting protein (TRIP) is a regulator of keratinocyte proliferation // *J Invest Dermatol*. 2011 Feb;131(2):349–57.
3. Aragona M., Panciera T., Manfrin A., Giulitti S., Michielin F., Elvassore N., Dupont S., Piccolo S. A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors // *Cell*. 2013 Aug 29;154(5):1047–59.
4. Calvo K.L., Ronco M.T., Noguera N.I., Garcia F. Benznidazole modulates cell proliferation in acute leukemia cells // *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2013 Aug;35(4):478–86.
5. Camicia R., Bachmann S.B., Winkler H.C., Beer M., Tinguely M., Haralambieva E., Hassa P.O. BAL1/ARTD9 represses the anti-proliferative and pro-apoptotic IFN γ -STAT1-IRF1-p53 axis in diffuse large B-cell lymphoma // *J Cell Sci*. 2013 May 1;126(Pt 9):1969–80.
6. Hirobe T., Terunuma E. Reduced proliferative and differentiative activity of mouse pink-eyed dilution melanoblasts is related to apoptosis // *Zoolog Sci*. 2012 Nov;29(11):725–32.
7. Gao J.L., Lv G.Y., He B.C., Zhang B.Q., Zhang H., Wang N., Wang C.Z., Du W., Yuan C.S., He T.C.. Ginseng saponin metabolite 20(S)-protopanaxadiol inhibits tumor growth by targeting multiple cancer signaling pathways // *Oncol Rep*. 2013 Jul;30(1):292–8.
8. Ershov V.A., Chirskii V.S., Viazovaia A.A., Narvskaja O.V., Lisianskaia A.S. Activity of proliferative and apoptotic processes in the integration of human papillomavirus type 16

DNA into the cervical epithelium // *Arkh Patol*. 2013 Mar-Apr;75(2):16–9.

9. Kurabi A., Pak K., Dang X., Coimbra R., Eliceiri B.P., Ryan A.F., Baird A. Ecr4 attenuates the inflammatory proliferative response of mucosal epithelial cells to infection // *PLoS One*. 2013 Apr 23;8(4):e61394.
10. Laptev M.V., Nikulin N.K. A mathematical model of paracrine regulation of the proliferative activity of epidermis with the participation of T-lymphocytes // *Biofizika*. 2010 Mar-Apr;55(2):361–74.
11. Samuels T.L., Pearson A.C., Wells C.W., Stoner G.D., Johnston N. Curcumin and anthocyanin inhibit pepsin-mediated cell damage and carcinogenic changes in airway epithelial cells // *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2013 Oct;122(10):632–41.
12. Shi H.L., Wu X.J., Liu Y., Xie J.Q. Berberine counteracts enhanced IL-8 expression of AGS cells induced by evodiamine // *Life Sci*. 2013 Nov 19;93(22):830–9.
13. Yuan Y., Zhang J., Cai L., Ding C., Wang X., Chen H., Wang X., Yan J., Lu J. Leptin induces cell proliferation and reduces cell apoptosis by activating c-myc in cervical cancer. // *Oncol Rep*. 2013 Jun;29(6):2291–6.
14. Wang H., Sun Y., Liu S., Yu H., Li W., Zeng J., Chen C., Jia J. Upregulation of progranulin by *Helicobacter pylori* in human gastric epithelial cells via p38MAPK and MEK1/2 signaling pathway: role in epithelial cell proliferation and migration. // *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2011 Oct;63(1):82–92.

Рецензенты:

Храмова И.А., д.м.н., профессор, врач акушер-гинеколог, Приморский Краевой Диагностический Центр, г. Владивосток;
Шульгина Л.В., д.б.н., профессор, заведующая лабораторией микробиологии, ФГУП «ТИНРО-Центр», г. Владивосток.
Работа поступила в редакцию 06.03.2014.