

12. Bone R.C. Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome what we do and do not about cytokine regulation // Crit. Care Med. – 1996. – Vol. 24. – № 1. – P. 163–172.

13. Weiss L.P. Functional organization of hematopoietic tissue. In: Hoffman R.H. et al. (eds). Hematology: Basic principles and Practice, 2nd ed. New York: Churchill Livingstone, 1995. – P. 193–206.

Координаты для связи с авторами: Добрых Вячеслав Анатольевич – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой пропедевтики внутренних болезней ДВГМУ, тел. +7-914-203-36-90, e-mail: sdobrykh@yandex.ru; Овчинникова Людмила Алексеевна – врач-лаборант 301-го ВКГ, Тен Татьяна Климентьевна – канд. мед. наук, доцент кафедры пропедевтики внутренних болезней ДВГМУ; Уварова Ирина Владимировна – ассистент кафедры пропедевтики внутренних болезней ДВГМУ; Онищенко Ирина Витальевна – заочный аспирант кафедры пропедевтики внутренних болезней ДВГМУ.



УДК 616.5-018.7-006:[616.013.92:612.015.8]:616-038

О.А. Лебедько^{1,2}, С.Г. Сапунцова¹, М.Ю. Флейшман¹, А.Ю. Мартыненко¹, С.С. Тимошин¹

ПРОЦЕССЫ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ЛОКАЛЬНЫЙ ОКСИДАТИВНЫЙ СТРЕСС В ПОКРОВНЫХ ЭПИТЕЛИЯХ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

¹Дальневосточный государственный медицинский университет,
680000, ул. Муравьева-Амурского, 35, тел. 8-(4212)-32-63-93, e-mail: nauka@mail.fesmu.ru;

²Институт охраны материнства и детства СО РАМН,
680022, ул. Воронежская, 49, кор. 1, тел. 8-(4212)-98-05-91, г. Хабаровск

Резюме

Изучали состояние процессов пролиферации (методом иммуногистохимии по экспрессии Ki-67) в эпителии кожи при atopическом дерматите (АД) и красном плоском лишае (КПЛ), в эпителии слизистой оболочки терминального отдела повздошной кишки при болезни Крона, в эпителии слизистой оболочки прямой кишки при геморрагической лихорадке с почечным синдромом (ГЛПС). Во всех случаях наблюдалась гиперрегенераторная реакция эпителия. При АД индекс Ki-67 позитивных ядер увеличился ($p < 0,05$) до $28,40 \pm 2,00$ %, при КПЛ – до $32,60 \pm 1,90$ % по сравнению с $8,65 \pm 1,31$ % в контроле. Индекс меченых ядер при болезни Крона составил $24,05 \pm 1,17$ %, в контроле – $10,64 \pm 0,62$ % ($p < 0,05$). При ГЛПС индекс экспрессии Ki-67 увеличился в 3,4 раза и составил $33,25 \pm 5,24$ % по сравнению с $9,89 \pm 1,87$ % в контроле ($p < 0,05$). Гиперрегенерация эпителия сопровождалась развитием локального оксидативного стресса. Показатели спонтанной, Fe^{2+} – индуцированной, H_2O_2 – индуцированной-люминолзависимой хемилюминесценции гомогенизированных биоптатов кожи при КП и АД, повздошной кишки при болезни Крона и прямой кишки при ГЛПС в 1,5–3,8 раза превышали соответствующие контрольные уровни. Обсуждается универсальность сочетания активации пролиферации и локального оксидативного стресса в покровных эпителиях при различных патологических процессах.

Ключевые слова: эпителий, пролиферация, оксидативный стресс, заболевания человека.

О.А. Lebed'ko^{1,2}, S.G. Sapuntsova¹, M.Yu. Fleyshman¹, A.Yu. Martynenko¹, S.S. Timoshin¹

STATE OF PROLIFERATION ASSOCIATED WITH THE LOCAL OXIDATIVE STRESS IN THE SURFACE EPITHELIUM IN VARIOUS DISEASES

¹Far Eastern State Medical University;

²Mother and Child Care Institute of Siberian Branch of Russian Academy for Medical sciences, Khabarovsk

Summary

We studied the status of proliferation processes (Ki67-immunohistochemistry) in skin epithelium from patients with atopical dermatitis (AD) and lichen planus (LP), in mucosal epithelium of the terminal part of the ileum from patients with Crohn's disease, in rectal mucosa epithelium from patients with hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS). Epithelial hyperregeneration was observed in all patient groups. The index of Ki-67-positive nuclei increased ($p < 0,05$) to $28,40 \pm 2,00$ % in patients with AD and to $32,6 \pm 1,9$ % in patients with LP vs. $8,65 \pm 1,31$ % in the reference sample. Labeling index increased ($p < 0,05$) to $24,05 \pm 1,17$ % in patients with Crohn's disease vs. $10,64 \pm 0,62$ % in the reference sample. The index expression of Ki-67 in patients with HFRS was 3,4 fold higher compared to the reference group ($33,25 \pm 5,24$ % vs. $9,89 \pm 1,87$ %, $p < 0,05$). Epithelial hyperregeneration followed by the development of local oxidative stress. Spontaneous,

Fe²⁺-induced and H₂O₂-induced luminol-dependent chemiluminescence in homogenized biopsates from the skin of patients with AD and LP, the ileum mucosa of patients with Crohn's disease, rectum mucosa of patients with HFSP was 1,8-2,3-fold higher compared to the reference groups. Universality of a combination of activation of proliferation and local oxidative stress in the surface epithelium in various pathological processes is discussed.

Key words: epithelium, proliferation, oxidative stress, human diseases.

Представления об участии свободных радикалов в реализации различных цитофизиологических процессов в последнее время пополняются новыми данными, в т. ч. сведениями о вовлеченности активных форм кислорода в процессы сигнальной трансдукции, опосредующие различные события клеточного цикла [8, 9, 14]. В исследованиях [15] показано участие системы «процессинг свободных радикалов – детоксикация свободных радикалов» в регуляции внутриядерного синтеза ДНК. Следует отметить, что сведения о роли активных форм кислорода в модуляции пролиферативной активности в условиях целостного организма носят единичный характер [8].

Цель настоящего исследования – изучение процессов пролиферации и свободнорадикального окисления в покровных эпителиях при различных заболеваниях.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования были избраны: эпителий кожи при atopическом дерматите и красном плоском лишае, эпителий слизистой оболочки терминального отдела подвздошной кишки при болезни Крона и эпителий слизистой оболочки прямой кишки при геморрагической лихорадке с почечным синдромом. На проведение исследования было получено согласие локальных этических комитетов соответствующих лечебно-профилактических учреждений, всеми пациентами были подписаны добровольные информированные согласия об участии в исследовании.

Обследовано 18 больных с atopическим дерматитом (АД) и 16 больных с красным плоским лишаем (КПЛ) в периоде обострения заболевания. Перед началом лечения проводили забор биоптатов кожи из пораженных участков. Контролем служили биоптаты нормальной кожи 24 пациентов, подвергнутых плановой хирургической операции по поводу грыж белой линии живота, левой и правой подвздошных областей.

Кроме того, в исследование были включены 45 больных с впервые выявленной болезнью Крона легкой и средней степени тяжести, с поражением терминального отдела подвздошной кишки в стадии обострения. Диагноз болезни Крона установлен на основании критериев Европейской организации по изучению болезни Крона и язвенного колита (2004 г.). Группу контроля составили 30 человек с функциональным заболеванием – синдромом раздраженного кишечника. Для исследования терминального отдела подвздошной кишки проводили фиброколоноскопию по стандартной методике аппаратами фирмы «Olympus» с торцевой оптикой. Выполнялась прицельная ступенчатая биопсия слизистой оболочки терминального отдела подвздошной кишки.

Также было обследовано 10 больных ГЛПС. Диагноз у всех заболевших подтвержден серологическим методом. Поводом для проведения ректороманоскопии с последующей пункционной биопсией было наличие

у пациентов на момент исследования диарейного синдрома. Во всех случаях, последующее двухкратное бактериологическое исследование кала не выявило наличия патогенной кишечной микрофлоры у больных ГЛПС. Ректоскопия проводилась с помощью ректоскопа с волокнистым световодом Ре-ВС-3-1 (модель 632) на 5-10-й день от начала заболевания. Указанный период болезни соответствует периоду ранней апирекции (ранний период заболевания) по классификации Шапиро С.Е. и Ковальского Г.С. [6]. Биопсия производилась стандартными ложкообразными щипцами на расстоянии 20-25 см от анального отверстия. Группу контроля составили 14 пациентов, которых обследовали по эпидемиологическим показаниям и при этом не было выявлено какой-либо патологии.

Прролиферативную активность в биоптатах кожи, слизистой оболочки подвздошной кишки и слизистой оболочки толстого кишечника оценивали по уровню экспрессии Ki-67. Биоптаты, фиксированные в «Иммунофиксе», проводили по батарее спиртов и ксилолов до заключения в гистовакс по стандартной методике. Срезы толщиной 5-7 мкм монтировали на обработанные полилизинном стекла («Sigma»). Использовали первичные готовые к применению антитела Rb Anti-Ki-67 (SP6) MAб фирмы SPRING bioscience в комплексе с полимерной системой детекции NovoLink «Novocastra Laboratories Ltd.». Для оценки специфичности иммуногистохимической реакции использовали метод негативного контроля. Срезы, вместо первичных антител, инкубировали с 1 % неиммунной сывороткой и далее проводили как с первичными антителами. Во всех контрольных экспериментах иммунопозитивная реакция отсутствовала. Докрашивали срезы гематоксилином Лилли-Майера. Индекс экспрессии Ki-67 (процент иммунопозитивных ядер) определяли после просмотра не менее тысячи клеток генеративной зоны.

Оценку биогенеза свободных радикалов в гомогенизированных биоптатах кожи, слизистой оболочки подвздошной кишки и слизистой оболочки толстого кишечника осуществляли методом хемилюминесценции (ХМЛ). ХМЛ регистрировали на люминесцентном спектрометре LS 50B «PERKIN ELMER». Алгоритм ХМЛ-исследования свободнорадикального статуса включал определение следующих параметров интенсивности спонтанного и активированного свечения [2]: Ssp – интенсивность процессинга свободных радикалов; h – содержание гидроперекисей липидов; Sind-1 – скорость образования перекисных радикалов; H – параметр, величина которого обратно коррелирует с перекисной резистентностью субстрата; Sind-2 – параметр, величина которого обратно коррелирует с активностью антиоксидантной антирадикальной защиты. Интенсивность ХМЛ, измеренную в милливольт-часах, рассчитывали на 1 г. влажной ткани и выражали в относительных единицах.

Результаты и обсуждение

Полученные данные свидетельствуют об однократной активации синтеза ДНК во всех исследуемых группах. В различных видах покровного эпителия, выполняющего специфические функции при различных этиологии и патогенезе заболеваний, имела место гиперрегенераторная реакция.

Индекс Ki67-позитивных ядер увеличился при atopическом дерматите до $28,40 \pm 2,00$ % и при красном плоском лишае – до $32,60 \pm 1,90$ %. В неизменной коже доноров этот показатель составил $8,65 \pm 1,31$ % ($p < 0,05$). Наряду с увеличением индекса Ki67-позитивных ядер, имеет место расширение генеративной зоны. В неизменной коже Ki67-позитивные ядра локализовались в базальном и нижнем отделах шиповатого слоя. При atopическом дерматите и красном плоском лишае меченые ядра идентифицировались в базальном, более высоких отделах шиповатого слоя. Единичные меченые ядра встречались в зернистом слое и нижнем отделе шиповатого слоя.

Гиперрегенераторная реакция наблюдалась также в эпителии слизистой оболочки подвздошной кишки. В неизменной слизистой оболочке индекс Ki67-позитивных ядер составил $10,64 \pm 0,62$ %, у пациентов с болезнью Крона он составил $24,05 \pm 1,17$ %, $p < 0,05$.

Данные иммуногистохимического анализа биоптатов слизистой оболочки прямой кишки при ГЛПС свидетельствуют об аналогичной направленности изменений пролиферативного статуса. В то время как в контрольной группе индекс экспрессии Ki-67 составил $9,89 \pm 1,87$ %, у больных ГЛПС он увеличился в 3,4 раза и составил $33,25 \pm 5,24$ % ($p < 0,05$).

Результаты ХМЛ-анализа указывают на формирование локального оксидативного стресса во всех группах исследования (таблица). В биоптатах кожи при АД показатель Ssp превышал аналогичный в контроле в 1,6 раза, при КПЛ – в 1,8 раза. При АД концентрация гидроперекисей липидов (h) превышала контрольные значения в 2,1 раза, при КПЛ – в 2,3 раза, скорость накопления перекисных радикалов липидной природы (Sind-1) возросла при АД в 1,6 раза, при КПЛ – в 1,9 раза. Нарушение процессинга свободных радикалов было обусловлено угнетением систем детоксикации: показатель Sind-2, значение которого обратно активности антиоксидантной антирадикальной системы, возрос в 2,1 раза при АД и в 2,2 раза при КПЛ. Снижалась устойчивость к перекисному окислению, на что указывает повышение показателя Н в 2,1 раза при АД и в 2,5 раза при КПЛ.

В биоптатах слизистой оболочки подвздошной кишки при болезни Крона также наблюдалось достоверное превышение всех показателей по отношению к группе контроля: Ssp – в 2 раза, Sind-1 – в 1,8 раза, h – в 2,3 раза, Sind-2 – в 2,1 раза, Н – в 2,3 раза.

В сравнении с контрольными показателями, в биоптатах слизистой оболочки прямой кишки у пациентов с ГЛПС зарегистрировано усиление генерации свободных радикалов (Ssp) – в 1,5 раза, повышение концентрации гидроперекисей липидов (h) в 3,8 раза. Перекисная резистентность и антиоксидантная антирадикальная защита были снижены, о чем свидетель-

ствуют увеличение соответствующих показателей: Н в 2,5 раза, Sind-2 в 1,2 раза.

ХМЛ-показатели локального оксидативного статуса при различных заболеваниях (M $\pm$ m)

	Ssp	Инд. ХМЛ (Fe ²⁺)		Инд. ХМЛ (люминол-H ₂ O ₂)	
		h	Sind-1	H	Sind-2
биоптаты кожи больных atopическим дерматитом (АД) и красным плоским лишаем (КПЛ)					
Группа сравнения	0,083 ± 0,005	0,071 ± 0,003	0,195 ± 0,007	0,104 ± 0,005	0,135 ± 0,011
Группа «АД»	0,136 ± 0,009*	0,150 ± 0,008*	0,309 ± 0,010*	0,217 ± 0,011*	0,286 ± 0,017*
Группа «КПЛ»	0,148 ± 0,009*	0,165 ± 0,009*	0,371 ± 0,010*	0,258 ± 0,010*	0,303 ± 0,015*
биоптаты слизистой оболочки подвздошной кишки у пациентов с болезнью Крона					
Группа сравнения	0,110 ± 0,020	0,120 ± 0,010	0,283 ± 0,012	0,172 ± 0,011	0,243 ± 0,023
Группа «болезнь Крона»	0,222 ± 0,021*	0,284 ± 0,029*	0,510 ± 0,020*	0,364 ± 0,021*	0,520 ± 0,020*
биоптаты слизистой оболочки толстого кишечника у больных в ранний период геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС)					
Группа сравнения	0,131 ± 0,005	0,128 ± 0,010	0,315 ± 0,013	0,202 ± 0,009	0,277 ± 0,010
Группа «ГЛПС»	0,202 ± 0,020*	0,486 ± 0,037*	0,346 ± 0,040*	0,502 ± 0,024*	0,329 ± 0,023*

Примечание. * – $p < 0,05$ по отношению к группе сравнения.

Активация процессов клеточного деления при повторных и хронических воздействиях неблагоприятных факторов имеет приспособительный характер, направленный на поддержание целостности эпителиального пласта. В случаях отсутствия активации или угнетения пролиферативных процессов имеет место образование язв и эрозий [5].

Важную роль в стимуляции синтеза ДНК играет активация процессинга активных форм кислорода [15]. При этом следует иметь в виду, что в клетках млекопитающих присутствует свыше 20 редокс-сенситивных факторов транскрипции (NF- κ B, AP-1, p53 и др.), которые, наряду с регуляцией пролиферативных процессов, определяют выраженность воспалительной реакции, экспрессию цитокинов и факторов роста [7].

По-видимому, стимуляция пролиферативных процессов в условиях усиления образования факторов транскрипции, цитокинов и факторов роста не может привести к полному восстановлению эпителиального пласта. Возможно, в данном случае оно достигается повторными циклами «пролиферация-апоптоз-пролиферация». Эта система ремоделирования эпителиального пласта в полной мере завершается, по-видимому, после нормализации гомеостаза. Известно, что в первые часы острого стрессорного воздействия имеет место так называемое «реактивное торможение» митозов, обусловленное G2 – М блоком. В ранее проведенных исследованиях нами было установлено, что реактивное торможение митозов в эпителии роговицы крыс в первые часы при однократном воздействии различных стрессоров (гипоксии, гипотермии и иммобилизационном воздействии) сменялось гиперрегенераторной

реакцией [3, 4, 5]. Согласно данным литературы, в этих условиях наблюдается гиперпродукция активных форм кислорода, в т. ч. радикальной природы [12].

Результаты наших исследований, а также данные литературы свидетельствуют, что при повторном или

хроническом воздействиях экстремального фактора, сопровождающихся активацией процессов свободно-радикального окисления, в покровных эпителиях имеет место гиперрегенераторная реакция, которая оценивается как неспецифический механизм адаптации.

Литература

1. Вдовенко С.В., Тимошин С.С. Влияние гипоксии на процессы клеточного деления эпителия роговицы и языка белых крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1983. – Т. 96. – № 8. – С. 86–87.
2. Лебедько О.А., Рыжавский Б.Я., Задворная О.В. Свободнорадикальный статус неокортекса белых крыс и его модификация экзогенными производными тестостерона // Дальневосточный медицинский журнал. – 2011. – № 4. – С. 95–99.
3. Мельник Е.И., Тимошин С.С. Влияние хронического стрессорного воздействия на процессы клеточного деления эпителия роговицы и языка белых крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1983. – № 1. – С. 93–94.
4. Радивоз М.И., Тимошин С.С., Баранов А.П., Мурзина Н.Б. Влияние многократного сублетального перегревания на цитогенетические процессы в эпителии роговицы и клетках костного мозга белых крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1982. – № 4. – С. 98–100.
5. Тимошин С.С., Алексеенко С.А., Боровская Т.Ф. и др. Нарушение процессов пролиферации эпителия слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта при язвах и эрозиях // Архив патологии. – 1991. – Т. 53. – № 3. – С. 37–40.
6. Шапиро С.Е., Ковальский Г.С. Вопросы патогенеза и классификации клинических форм и вариантов геморрагической лихорадки с почечным синдромом // Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом на Дальнем Востоке. – Хабаровск, 1968. – С. 169–176.
7. Brigelius-Flohé R., Flohé L. Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors // Antioxid. Redox. Signal. – 2011. – Vol. 15. – № 8. – P. 2335–2381.
8. Chiu J., Dawes I.W. Redox control of cell proliferation // Trends. Cell Biol. – 2012. – Vol. 22. – № 11. – P. 592–601.
9. Circu M.L., Aw T.Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis // Free Radic. Biol. Med. – 2010. – Vol. 48. – № 6. – P. 749–762.
10. Forman H.J., Maorino M., Ursini F. Signaling functions of reactive oxygen species // Biochemistry. – 2010. – Vol. 49. – № 5. – P. 835–842.
11. Locasale J.W., Cantley L.C. Metabolic flux and the regulation of mammalian cell growth // Cell Metab. – 2011. – Vol. 14. – № 4. – P. 443–451.
12. Menon S.G., Goswami P.C. A redox cycle within the cell cycle: ring in the old with the new // Oncogene. – 2007. – Vol. 26. – № 8. – P. 1101–1109.
13. Ray P.D., Huang B.W., Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling // Cell Signal. – 2012. – Vol. 24. – № 5. – P. 981–990.
14. Sarsour E.H., Kumar M.G., Chaudhuri L., et al. Redox control of the cell cycle in health and disease // Antioxid. Redox Signal. – 2009. – Vol. 11. – № 12. – P. 2985–3011.
15. Shlomai J. Redox control of protein-DNA interactions: from molecular mechanisms to significance in signal transduction, gene expression, and DNA replication // Antioxid. Redox Signal. – 2010. – Vol. 13. – № 9. – P. 1429–1476.

Координаты для связи с авторами: Лебедько Ольга Антоновна – д-р мед. наук, зав. лабораторией комплексных методов обследования НИИ ОМиД СО РАМН, ведущий научный сотрудник ЦНИЛ ДВГМУ, тел. +7-914-542-70-61, e-mail: leoaf@mail.ru; Сатунцова Наталья Геннадьевна – канд. мед. наук, доцент кафедры дерматовенерологии ДВГМУ; Флейшман Марина Юрьевна – доктор мед. наук, главный научный сотрудник ЦНИЛ ДВГМУ; Мартыненко Александр Юрьевич – канд. мед. наук, доцент кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ДВГМУ; Тимошин Сергей Серафимович – д-р мед. наук, профессор, зав. ЦНИЛ ДВГМУ.

