<https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-185-1-106-110>

Тканевая гипоксия при болезни Крона у детей: маркеры и методы преодоления*

Федулова Э.Н., Шумилова О.В., Широкова Н.Ю.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Н. Новгород, пл. Минина Пожарского, д10/1, 603155 Россия

Для цитирования: Федулова Э.Н., Шумилова О.В., Широкова Н.Ю. Тканевая гипоксия при болезни Крона у детей: маркеры и методы преодоления. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2021;185(1): 106–110. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-185-1-106-110

✉ Для переписки:

**Федулова
Эльвира Николаевна**
fedulova04@mail.ru

Федулова Эльвира Николаевна, д.м.н., главный научный сотрудник отдела «Ревматологических и других системных заболеваний»

Шумилова Ольга Владимировна, к.м.н., младший научный сотрудник отдела «Ревматологических и других системных заболеваний»

Широкова Наталья Юрьевна, к.м.н., научный сотрудник лабораторно-диагностического отдела, группы морфологических исследований

Резюме

Цель: определить маркеры тканевой гипоксии при болезни Крона у детей: маркеры и методы её преодоления.

Материалы и методы: Обследовано 27 детей с болезнью Крона (БК) в возрасте от 1 года до 18 лет.

Гистологический, гистоморфометрический и иммуногистохимический анализ биоптатов слизистой оболочки толстой кишки

Результаты: выявлены морфологические маркеры тканевой гипоксии при БК: наличие преимущественно незрелых фибробластов, инфильтрация мышечной пластинки нейтрофильными гранулоцитами, некротизирующий васкулит, феномен группировки неактивных макрофагов между собой с формированием многоядерных клеток, являющихся предшественниками многоядерных гранул по типу Пигорова-Ланханса

Заключение: при выявлении маркеров тканевой гипоксии, приводящей к ухудшению прогноза течения БК и развитию осложнений необходимо определить тактику ускоренной «step-up» терапии с применением антицитокиновых препаратов и подключить методику гипербарической оксигенации.

Ключевые слова: болезнь Крона, тканевая гипоксия, гипербарическая оксигенация

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

* Иллюстрации к статье – на цветной вклейке в журнал.

<https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-185-1-106-110>

Tissue hypoxia in Crohn's disease in children: markers and coping methods*

E. N. Fedulova, O. V. Shumilova, N. Yu. Shirokova

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Privolzhsky Research Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Federation, N. Novgorod, pl. Minin Pozharsky, d10 / 1, 603155, Russia

For citation: Fedulova E. N., Shumilova O. V., Shirokova N. Yu. Tissue hypoxia in Crohn's disease in children: markers and coping methods. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2021;185(1): 106–110. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-185-1-106-110

Elvira N. Fedulova, MD, DSc, Chief Researcher of the Department of Rheumatological and Other Systemic Diseases;
ORCID: 0000-0002-1774-0692

Olga V. Shumilova, Ph.D., junior researcher of the department of «Rheumatological and other systemic diseases»

Natalya Yu. Shirokova, Ph.D., Researcher, Laboratory and Diagnostic Department, Morphological Research Group

✉ Corresponding author:

Elvira N. Fedulova
fedulova04@mail.ru

Summary

Objective: to identify markers of tissue hypoxia in Crohn's disease in children: markers and methods for overcoming it.

Materials and methods: 27 children with Crohn's disease (CD) aged from 1 year to 18 years were examined.
Histological, histomorphometric and immunohistochemical analysis of biopsy samples of the colon mucosa.

Results: morphological markers of tissue hypoxia in CD were identified: the presence of predominantly immature fibroblasts, infiltration of the muscle plate by neutrophilic granulocytes, necrotizing vasculitis, the phenomenon of the grouping of inactive macrophages with each other with the formation of multinucleated cells, which are the precursors of multinucleated granules according to the Pigorov-Lanhans type

Conclusion: in identifying markers of tissue hypoxia, leading to a worsening prognosis of the course of CD and the development of complications, it is necessary to determine the tactics of accelerated "step-up" therapy using anticytokine drugs and use the method of hyperbaric oxygenation.

Keywords: Crohn's disease, tissue hypoxia, hyperbaric oxygenation

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest.

* Illustrations to the article are on the colored inset of the Journal.

Введение

Болезнь Крона – хроническое неспецифическое рецидивирующее заболевание, характеризующееся сегментарным, трансмуральным поражением стенки желудочно-кишечного тракта с образованием воспалительных инфильтратов и глубоких язв, а также развитием внекишечных проявлений болезни и осложнений местного и системного характера [1, 2].

БК имеет различные маски как манифестации, так и последующего течения, от чего во многом зависит тактика их лечения [3].

Болезнь Крона, согласно Монреальской классификации, протекает по воспалительному, стенозирующему и пенетрирующему варианту [4].

Среди всех пациентов с БК в начальном периоде заболевания 5–15% имеют стриктуры, 5–15% – пене-трацию и свищи и у 70–80% болезнь носит воспали-тельных характер [5]. В течение 10 лет от дебюта картина меняется на противоположную и у 70% больных возникают осложнения в виде стенозов

(1/3 от всех осложнений) и свищей. По данным Гвидо Адлера (2001) стриктуры кишечника об-наруживаются у 30–50% пациентов с болезнью Крона [6]. В среднем около 50% больных в период от 10 до 20 лет имеют осложнения и им показана более агрессивная терапия, предотвращающая эти осложнения [7].

Патогенез воспалительных заболеваний ки-шечника до сих пор до конца не раскрыт. При обоих заболеваниях недостаточно представлен механизм взаимодействия клеточных элементов, сосудов микроциркуляторного русла, соединительноткан-ных структур в слизистой оболочке кишечника [8].

Несмотря на наличие стандартов лечения воспа-лительных заболеваний кишечника у детей, выбор индивидуальной тактики терапии, определение её эффективности остаётся трудной задачей, да-лёкой от окончательного своего решения. В пе-диатрической практике до настоящего времени основными в лечении остаются препараты 5-АСК,

кортикостероиды, цитостатики, а при отсутствии эффекта от консервативной терапии проводится хирургическое вмешательство. Основные принципы терапии БК у детей обусловлены нозологией и тяжестью заболевания, что было представлено в алгоритме, принятом совместными усилиями педиатрической группы ECCO и ESPGHAN, Российской группы по изучению ВЗК [9]. Однако следует отметить, что лечебная тактика основана на клинических признаках тяжести болезни на момент осмотра и не учитывает факторы-предикторы дальнейшего развития болезни.

Таким образом, несмотря на определённые достижения в понимании патогенеза воспалительных

заболеваний кишечника, этот вопрос остаётся до конца не изученным. Не определены особенности инфильтративно-соединительнотканых взаимодействий в формировании тканевой гипоксии и играющих, по нашему мнению, важную роль в развитии патологического процесса.

В связи с этим считаем актуальным совершенствование диагностики, прогнозирования течения воспалительных заболеваний кишечника у детей и индивидуализация лечения на основе клинико-патогенетических особенностей. Для достижения этой цели необходимо выявить морфологические изменения при болезни Крона, их различном течении у детей.

Материалы и методы

Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России. Обследовано 27 детей с БК в возрасте от 1 года до 18 лет.

Выполнен гистологический, гистоморфометрический и иммуногистохимический анализ биоптатов слизистой оболочки толстой у детей при первичной госпитализации в стационар. Материал фиксировали в 10% нейтральном формалине, обезживали в спиртах восходящей концентрации и заливали в парафин. Полученный блок нарезали на срезы по 4–5 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином, альциановым синим и реактивом Шиффа.

Обработка цифрового материала результатов исследования выполнена с использованием пакета компьютерной программы Statistica 6.0 for Windows XP, Biostat в соответствии с общепринятыми методами медицинской статистики. Применялся специальный программный пакет статистического анализа DiaStat, основанный на алгоритмах многомерного энтропийного анализа.

При сравнении полученных данных в случае большой выборки и правильного распределения признаков пользовались критерием Стьюдента, описательная статистика признака включала среднюю арифметическую (M), стандартную ошибку средней (m).

При небольших выборках и непараметрическом распределении признаков применялись критерии Манна-Уитни, Вальда-Вольфовица, при сравнении долей – углового преобразования Фишера, двух зависимых величин – критерий Вилкоксона. Для выявления взаимосвязи показателей использовалась линейная корреляция Пирсона (r), ранговая Спирмена (ρ). Проводился расчёт относительного риска (ОР) того или иного течения заболевания, значение которого принималось во внимание, если их 95% доверительный интервал (ДИ) не включал единицу. Описательная статистика признака при непараметрическом распределении была представлена медианой (Me), интерквартильным размахом (Q_{25} – Q_{75}), который не зависимо от вида распределения составлял 50% значений в выборке.

Результаты

Известно, что болезнь Крона протекает по трём вариантам: воспалительному, стенозирующему и пенетрирующему (свищевому). Благоприятным, неосложненным, является только воспалительный тип заболевания. Два других – неблагоприятные, осложненные, варианты, часто требующие хирургического вмешательства. При манифестации заболевания довольно трудно предсказать её дальнейшее течение, поэтому выявление ранних прогностических критериев очень важно для определения тактики ведения пациентов с целью предотвращения осложнений. Изменения на уровне ткани по времени опережают клинические и эндоскопические признаки болезни, что для раннего прогноза очень важно.

Для оценки прогностической значимости морфологических признаков при болезни Крона нами были ретроспективно проанализированы колонобиоптаты у детей с толстокишечной локализацией процесса при первичном обращении их в стационар. Сравнивались морфометрические результаты у 15 детей с неосложненной формой болезни Крона

(инфильтративной) и у 12 детей с осложненной (стенотической, свищевой).

Выявлено, что у больных с разным течением болезни Крона уже в её начале имелись значительные различия при морфометрическом анализе колонобиоптатов. Так, в группе с неосложненным течением заболевания в этот период отмечалась более выраженная глубина крипт по сравнению с осложненным вариантом (462 [440–478], 399 [371–427]; $p=0,004$). Кроме того, у детей с инфильтративной формой имела место интенсивная лимфоцитарная инфильтрация поверхностного эпителия (10,7 [8,6–12,8], 5,9 [4,6–7,2]; $p=0,004$) при более высоком содержании бокаловидных клеток (14,4 [12,3–16,5], 7,6 [6,2–9,1]; $p=0,004$). В эпителии крипт при благоприятном течении определялось большее количество эндокринных клеток (0,9 [0,8–1,0], 0,7 [0,6–0,8]; $p=0,004$) и нейтрофильных гранулоцитов (2,1 [1,7–2,6], 1,2 [0,7–1,7]; $p=0,004$), при этом лимфоцитов было меньше по сравнению с неблагоприятным вариантом болезни (4,4 [3,8–5,1], 5,3 [4,7–6,0]; $p=0,023$).

Клеточная плотность в собственной пластинке слизистой оболочки была значительно выше при осложненной форме болезни Крона как под эпителием (12326 [11928–12706], 10227 [9709–10746]; $p=0,004$), так и в основании крипт (13789 [13292–14187], 10558 [10275–10841]; $p=0,004$). Наряду с этим, если при благоприятном варианте заболевания имело место её равномерное распределение, напротив, при осложненном варианте клеточная плотность воспалительного инфильтрата была выше преимущественно в глубоких отделах, в основании крипт, что могло быть причиной поражения мышечной пластинки слизистой оболочки и других слоев стенки кишки. При осложненном течении отношение клеток-иммигрантов к клеткам-резидентам превышало таковое при неосложненном (1,71 [1,62–1,83], 1,64 [1,48–1,69]; $p=0,0001$), что свидетельствовало о высокой активности воспалительного процесса у этой категории больных за счёт повышенного числа лимфоцитов (4206 [3809–4603], 2953 [2642–3096]; $p=0,004$), плазмócитов (3551 [3159–3944], 2695 [2294–3096]; $p=0,004$) и нейтрофильных гранулоцитов (398 [347–451], 310 [258–524]; $p=0,023$). Число клеток-резидентов было снижено преимущественно в результате относительно небольшого количества макрофагов (390 [360–396], 492 [444–542]; $p=0,004$), регулирующих процесс коллагенообразования.

Обращает на себя внимание разница в фибропластической активности в строме слизистой оболочки, достоверно выше она была при неблагоприятном течении: как по количеству фибробластов (2415 [2047–2784], 1935 [1549–3221]; $p=0,023$), так и по числу фиброцитов (1912 [1544–2278], 1308 [1006–1610]; $p=0,023$).

В собственной пластинке слизистой оболочки у этих пациентов уже в начальном периоде болезни отмечалось снижение количества сосудов микроциркуляторного русла (206 [188–234], 498 [401–524]; $p=0,004$), что в значительной степени нарушало её трофику и репарацию.

Основной причиной образования кишечных осложнений при болезни Крона является вовлечение в патологический процесс мышечной ткани, в результате фиброзирования которой образуются стенозы, стриктуры, а также при активном её воспалении – свищи. Маркером состояния мышечной ткани толстой кишки в биопсийном материале является мышечная пластинка слизистой оболочки. Анализ её состояния представляется нам важным и интересным. Если в норме мышечная пластинка слизистой оболочки кишечника состоит только

из лейомиоцитов, то при болезни Крона выявлена инфильтрация её форменными элементами крови (табл. 1.), причем при осложненном течении клеточная плотность оказалась выше (6367 [6067–6667], 4523 [4036–5020]; $p=0,004$). При этом инфильтрат был представлен в основном лимфоцитами (3517 [3177–3857], 962 [861–1063]; $p=0,004$), а также, в отличие от благоприятного варианта, имели место нейтрофильные гранулоциты (139 [111–162], 0; $p=0,002$).

Морфометрические показатели биоптатов слизистой оболочки толстой кишки представлены в таблице 2. Выявлена достоверная разница в распределении клеточной плотности инфильтрата собственной пластинки слизистой оболочки: при неблагоприятном варианте заболевания она была значительно выше в глубоком отделе (в 75% случаев против 33,3%, $p=0,03$). Концентрация воспалительного инфильтрата в глубоких отделах слизистой оболочки может обуславливать поражение мышечной пластинки слизистой и других слоев стенки кишки и повышает риск развития осложнений в 2,2 раза (95% ДИ 1,7–3,0).

Выявлено, что при неблагоприятном варианте болезни Крона помимо

сниженного количества сосудов микроциркуляторного русла, в значительном проценте случаев выявлялся деструктивный васкулит (у 83,3% пациентов против 13,3%, $p=0,0003$). Это может быть рассмотрено в качестве одного из механизмов развития осложнений в условиях нарушения кровоснабжения, тканевой гипоксии поврежденных тканей (ОР 6,3 (95% ДИ (3,8–10,4)).

Интересно, что при неблагоприятном прогнозе отмечалась высокая фибропластическая активность с большей долей функционально незрелых юных фибробластов (в 83,3% случаев против 20%, $p=0,001$). Это свидетельствует об активном фибротическом процессе, что может быть предшественником развития осложнений болезни (стеноз, стриктура) (ОР 4,2 (95% ДИ 2,8–6,2)). При этом макрофаги в собственной пластинке слизистой оболочки у этой категории больных находились преимущественно в неактивной форме (у 91,7% пациентов против 13,3%, $p=0,0001$) (ОР 6,9 (95% ДИ 4,2–11,4)). Тогда как у детей с неосложненным течением болезни они были активными. Кроме того, у детей с осложненным течением болезни Крона, выявлен феномен группировки неактивных макрофагов между собой с формированием многоядерных клеток, являющихся предшественниками многоядерных гранулем по типу Пигорова-Ланханса (рис. 1.).

показатели	неосложненная БК, n=15	осложненная БК, n=12	p
Клеточная плотность	4523 [4036–5020]	6367 [6067–6667]	0,004
миоциты	3166 [2939–3393]	2508 [2258–2758]	0,004
лимфоциты	962 [861–1063]	3517 [3177–3857]	0,004
эозинофильные гранулоциты	395 [327–463]	342 [272–412]	0,332
нейтрофильные гранулоциты	0	139 [111–162]	0,002

Таблица 1.
Морфометрические показатели мышечной пластинки слизистой оболочки при разном течении болезни Крона у детей

Примечание:
n- число детей, p- достоверность отличий между группами

Таблица 2.

Частота выявления прогностических морфологических критериев течения болезни Крона у детей

Примечание:

п – число пациентов,
р – достоверность отличий между группами (двусторонний Фишера),
ОР – отношение рисков развития осложненного варианта БК над неосложненным

морфологический признак		БК неосложн n=15		БК осложн n=12		р	ОР	ДИ
		абс	%	абс	%			
крипт-абсцессы	есть	1	6,7	5	41,7	0,03	6,2	2,9–13,4
	нет	14	93,3	7	58,3			
клеточная плотность в глубоком отделе СПСО превышает плотность под эпителием	есть	5	33,3	9	75	0,03	2,2	1,7–3,0
	нет	10	66,7	3	25			
деструктивный васкулит	есть	2	13,3	10	83,3	0,0003	6,3	3,8–10,4
	нет	13	86,7	2	16,7			
преимущественно юные фибробласты СПСО	есть	3	20	10	83,3	0,001	4,2	2,8–6,2
	нет	12	80	2	16,7			
неактивные макрофаги макрофагов СПСО	есть	2	13,3	11	91,7	0,0001	6,89	4,2–11,4
	нет	13	86,7	1	8,3			
выраженная диссоциация мышечной пластинки	есть	1	6,7	11	91,7	0,0001	13,7	6,6–28,5
	нет	14	93,3	1	8,3			

Состояние мышечной пластинки слизистой оболочки может характеризовать глубину поражения и косвенно судить о структуре и функции мышечной ткани кишки (рис. 2.). В норме она представлена исключительно миоцитами, тогда как при болезни Крона в ней обнаруживались инфильтративные элементы,

приводящие к диссоциации мышечной пластики. При неблагоприятном прогнозе отмечалась выраженная инфильтрация мышечной пластинки с обнаружением помимо лимфоцитов и нейтрофильных гранулоцитов (в 91,7% случаев против 6,7%, $p=0,0001$), что повышало риск осложнений в 13,7 раз (95% ДИ 6,6–28,5).

Обсуждение

Следовательно, прогнозирование течения болезни Крона уже при первичной постановке диагноза очень важно, так как от этого во многом зависит тактика ведения пациентов. В случае выявления признаков тканевой гипоксии: наличие преимущественно незрелых фибробластов, инфильтрация мышечной пластинки нейтрофильными гранулоцитами, некротизирующий васкулит, феномен

группировки неактивных макрофагов между собой с формированием многоядерных клеток, являющихся предшественниками многоядерных гранул по типу Пигорова-Ланхганса, способствующих развитию осложнений, необходима более активная терапия с подключением гормонов и цитостатиков и при их неэффективности антицитокиновых препаратов, метода гипербарической оксигенации.

Литература | References

- Baranov A. A., Potapov A. S., Tsimbalova E. G. Modern technology for diagnosis and treatment of inflammatory bowel diseases in children. *Bulletin of the RAMS*. 2011. No. 6, pp.36–41.
Баранов, А. А. Современные технологии диагностики и лечения воспалительных заболеваний кишечника у детей / А. А. Баранов, А. С. Потапов, Е. Г. Цимбалова // Вестник РАМН. – 2011. – № 6. – С. 36–41.
- Kornienko, E. A. Inflammatory bowel disease in children. Moscow. Prima Print, 2014, 208 p.
Корниенко, Е. А. Воспалительные заболевания кишечника у детей / Е. А. Корниенко – Москва: Прима Принт, 2014. – 208 с.
- Vorobiev G. I., Khalif I. L. Inflammatory bowel disease. Moscow, Miklos, 2008, 424 p.
Воробьев, Г. И. Воспалительные заболевания кишечника / Г. И. Воробьев, И. Л. Халиф. – М.: Миклош, 2008. – 424 с.
- Satsangi J., Satsangi J., Silverberg M. S., Vermeire S., Colombel J. F. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus and implications. *Gut*, 2006, vol. 55, pp. 749–753.
- Romberg-Camps M. J., Dagnelie P. C., Kester A. D., et al. Influence of phenotype at diagnosis and of other potential prognostic factors on the course of inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol*, 2009, vol. 104, pp. 371–383.
- Adler G. Crohn's disease and ulcerative colitis. G. Adler; per. with him. Moscow. GOETAR-Media, 2001. 527 p.
Адлер, Г. Болезнь Крона и язвенный колит / Г. Адлер; пер. с нем. – М.: ГОЭТАР-Медиа, 2001. – 527 с.
- Gupta N., Cohen S. A., Bostrom A. G., et al. Risk factors for initial surgery in pediatric patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*, 2006, vol. 130, pp. 1069–1077.
- Fedulova E. N., Shumilova O. V., Shirokova N. Yu. Early morphological criteria for complicated crohn forms in children. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2017;(10):15–19.
Ранние морфологические критерии осложненных форм болезни Крона у детей / Федулова Э. Н., Шумилова О. В., Широкова Н. Ю. // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2017. – № 10 (146). – С. 15–19.
- Kornienko E. A., Khavkin A. I., Fedulova E. N., et al. Draft recommendations of the russian society of pediatric gastroenterology, hepatology and nutrition on diagnosis and treatment of Crohn's disease in children. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2019;(11):100–134. (In Russ.) Doi:10.31146/1682-8658-ecg-171-11-100-134
Проект рекомендаций Российского общества детских гастроэнтерологов, гепатологов и нутрициологов по диагностике и лечению болезни Крона у детей / Корниенко Е. А., Хавкин А. И., Волюнец Г. В., Габруская Т. В., Скворцова Т. А. // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2019. – № 11 (171). – С. 100–134.

К статье

Тканевая гипоксия при болезни Крона у детей: маркеры и методы преодоления (стр. 106–110)

To article

Tissue hypoxia in Crohn's disease in children: markers and coping methods (p. 106–110)

Рисунок 1.

Образование многоядерной гигантской клетки (эпителиодной гранулемы) при осложненном течении БК. Окраска гематоксилином и эозином. Увел. 1×100

Рисунок 2.

Выраженная диссоциация мышечной пластинки при осложненном течении болезни Крона. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 1×100.