

МОРФОЛОГИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 571.27

МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ТКАНЕЙ ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА ОБЕЗЬЯН, ПОГИБШИХ ПРИ ЯВЛЕНИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО ЭНТЕРОКОЛИТА

Амаба С.Т.¹, Конджария И.Г.¹, Трапш Х.З.¹, Дьяченко А.Г.², Матуа А.З.¹, Миквабия З.Я.¹

¹ГНУ «Институт экспериментальной патологии и терапии Академия наук Абхазии», Сухум

²Сумской государственной университет, Сумы

ХУЛОСА

Мақсад. Маймунларнинг йўгон ичак тўқималарида сурункали колит белгилар мавжудлигида морфологик ўзгаришларни баҳолаш эди.

Материал ва усуллар. НИИ ЭПуТ АНА қошидаги Сухуми питомнигида ичагида оғир сурункали яллигланиш жараени кечатган 10 маймун (5 яван макакалар ва 5 макака резус) назорат остида бўлди. Тўқималар намунаси 10% формалинда фиксация қилинди ва кейин улардан парафин блоklar тайёрланди. 4-5 мкм қалинли кесмалар гематоксилин-эозин билан бўялди ва «CarlZeissPrimoStar» микроскопи ёрдамида таҳлил қилинди. Иммуногистохимё тадқиқотларни миелопероксидаза (МПО)га қарши антитаналар ердамида текширилди, матрица металлопротеиназа-1 (ММП), Ki-67 ва CD68. Кейинги поғонада диаминобензидин (DAB) ердамида визуализация ўтказилди.

Натижалар. Патоморфологик тадқиқотларнинг кўрсатишича маймунларда ичакда яллигланиш касалликлар дастлаб ривожланиши иммуноцитларни lamina propria-га миграциясидан кечади ва йўгон ичак сурункали жараенга қўшилади, ва айрим ҳолларда эса бутун ичакда сурункали жараен яллигланишига қўшилади. Ўтқир зўриқиш даврда нейтрофил инфильтрация, крипталарда абсцесс, муцинни деплецияси ва язвалар намоен бўлади. Зўриқишлар касалликни ривожланишига олиб боради, крипталар бузилади ва сўрилиш қобилияти бузилади, ва охир-оқибат ҳайвонларни ўлимига олиб келади. Ульцероз колит 10% тадқиқот қилинган ҳайвонларда кузатилди. Тадқиқотлар макакаларни одамларда кечадиган ичак яллигланиш касалликларни адекват модели бўлишини тасдиқлади, ва уларни ушбу тадқиқотларни олиб боришида қиймати чексиз объект деб ҳисоблаш мумкин.

Калит сўзлар: ичакнинг яллигланиш касалликлари, макакалар, патоморфология, сурункали колит, нейтрофил инфильтрация, крипталар абсцесс, муцин деплецияси, ульцероз колит, ҳайвонларнинг ичак касалликлари.

SUMMARY

Objective. To evaluate morphological changes in the colon tissues of monkeys with chronic enterocolitis.

Material and methods. Under observation were 10 monkeys from the Sukhumi nursery at the Research Institute of Epidemiology and Traumatology of the Academy of Sciences (5 Javanese macaques and 5 rhesus macaques), which developed a severe chronic inflammatory process in the intestine. Tissue samples were fixed in 10% formalin, after which paraffin blocks were made. Sections of 4-5 µm thickness were stained with hematoxylin and eosin and analyzed using a Carl Zeiss Primo Star microscope. Immunohistochemical studies were performed using antibodies to myeloperoxidase (MPO), matrix metalloproteinase-1 (MMP), Ki-67 and CD68, followed by visualization using diaminobenzidine (DAB).

Results: Pathomorphological studies have shown that inflammatory bowel diseases in macaques develop with the initial migration of immunocytes to the lamina propria, which leads to the involvement of the colon and, in some cases, the entire intestine in the chronic inflammatory process. During acute exacerbations, neutrophilic infiltration, crypt abscesses, mucin depletion, and ulcers are observed. These exacerbations contribute to disease progression, crypt destruction, and malabsorption, which ultimately leads to death in animals. Ulcerous colitis was recorded in 10% of the studied animals. The study confirms that macaques are an adequate model of inflammatory bowel disease in humans, which makes them a valuable object for further research in this area.

Keywords: inflammatory bowel disease, macaques, pathomorphology, chronic colitis, neutrophilic infiltration, crypt abscesses, mucin depletion, ulcerative colitis, intestinal diseases of animals.

Неспецифические воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) представляют собой гетерогенную группу хронических воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта человека, среди которых болезнь Левенского-Крона (БК) и язвенный колит (ЯК) относятся к двум основным клиническим формам. Несмотря на большой прогресс в понимании патогенеза этих заболеваний, их этиология остается неясной. Предполагается, что малнутриция (нарушения питания) является основой возникновения ВЗК, в то же время генетические, иммунные и экологические факторы играют ключевую роль. БК и ЯК обладают широким спектром клинических проявлений, и их гетерогенность была подчеркнута во многих эпидемиологических исследованиях, сконцентрированных на выявлении подгрупп и фенотипов этих заболеваний. Однако около 10-15% пациентов с ВЗК не отвечают критериям ЯК или БК. Эти случаи квалифицируются как неопределенный колит (1,12,13,14). Многочисленными исследователями предпринято огромное количество попыток получить адекватную модель ВЗК на мелких лабораторных животных. И хотя в целом эти попытки следует расценивать как достаточно успешные, все же сохраняется целый ряд отличий между ВЗК и экспериментальными моделями. В этих условиях очень важными представляются исследования на нечеловеческих приматах разных видов, демонстрирующих признаки хронического воспалительного процесса кишечника в местах их содержания. Эти немногочисленные наблюдения чаще всего ограничивались регистрацией клинической картины и основных лабораторных и микробиологических данных (4,6,8,9,10,11,15.).

Под нашим наблюдением находились 10 обезьян Сухумского питомника при НИИ ЭПит АНА (5 макак яванских и 5 макак резусов), у которых развился тяжелый хронический воспалительный процесс в кишечнике. Несмотря на интенсивную комплексную терапию, 5 макак яванских и 3 макака резуса погибли. Ниже представлены результаты гистологического и иммуногистохимического исследования образцов ткани толстого кишечника погибших обезьян.

Цель исследования: оценка морфологических изменений тканей толстого кишечника обезьян при явлениях хронического энтероколита.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Гистопатологический анализ: Образцы ткани толстого кишечника размером 3-5 мм фиксировали в 10% формалине в фосфатном буфере в течение 48 ч и погружали в парафиновые блоки. Последние помещали в микротом (EM UC7, Leica, Германия), на котором делали срезы толщиной 4-5 мкм. Тканевые срезы депарафинировали, гидратировали, помещая в ксилол, а затем понижающиеся концентрации этанола, фиксировали на стеклах и красили гематоксилин-эозином (ГЭ).

Микроскопические исследования проводились с помощью микроскопа «Carl Zeiss Primo Star», осна-

щенного цифровой камерой «Zeiss AxioCam ERs 5s» и программным обеспечением «ZEN 2 (blue edition)», с получением изображений при окуляре $\times 10$, объективах $\times 40$, $\times 100$ и $\times 400$.

Гистоморфологический анализ выполнял опытный патоморфолог. Степень тканевых повреждений определяли, как (0) норма – без повреждений, (1) слабые повреждения, (2) умеренные повреждения и (3) серьезные повреждения (5). На каждом слайде анализировали 10 полей зрения.

Имуногистохимический анализ: с парафиновых блоков выполнены серийные срезы толщиной 5 мкм. После экспозиции в термостате (570С, 30-60 мин) ткани депарафинировали путем погружения последовательно в ксилол и серию водных растворов спирта с уменьшающейся концентрацией. Демаскировка антигенных детерминант выполнялась путем нагрева в водяной бане в 0,01М цитрате натрия (970С, 30 мин). Эндогенную рецепторную пероксидазную активность блокировали препаратом «UltraVision Hydrogen Peroxidase Block» («Thermo Scientific», США) в течение 10 мин с последующей промывкой в фосфатно-буферном солевом растворе (ФБР). Далее слайды инкубировали с первичными антителами (370С, 30 мин). После амплификации сигналов с помощью набора «Primary Antibody Amplifier Quanto» («Thermo Scientific», США), проводили инкубацию со смесью вторичных антител («HRP Polymer Quanto») (10 мин). Положительные окрашенные слайды визуализировали диаминобензидином (DAB Quanto, «Thermo Scientific», США) под контролем микроскопа. DAB-негативные структуры были идентифицированы путем дополнительного окрашивания гематоксилином Майера. Промывку в ФБР проводили между всеми стадиями иммуногистохимического исследования.

В работе изучали экспрессию следующих биомаркеров:

Миелопероксидаза (МПО) – маркер воспаления, фермент, экспрессируемый в основном в гранулоцитах, высвобождается во время воспалительных процессов. Реакция МПО с перекисью водорода или тирозином дает высоко цитотоксические продукты, которые способствуют повреждению тканей при ВЗК. МПО может быть выявлена в стуле или ткани кишечника. Концентрация МПО достоверно статистически возрастает у пациентов с активным заболеванием и демонстрирует значительную корреляцию с ЯК. Исследования показали, что высокая концентрация МПО после лечения указывает на недостаточную его эффективность (2). В работе использованы кроличьи поликлональные АТ («Thermo Scientific», США).

Матричная металлопротеиназа-1(ММП) - представляют собой семейство ключевых биологических медиаторов, участвующих в деградации и восстановлении компонентов внеклеточного матрикса. ММП считаются основными факторами

повреждения тканей кишечника, опосредованного Т-лимфоцитами. ММП выражены в воспалительных зонах и изъязвлениях в кишечнике. Доказано также, что ММП-1/2 (по факту, коллагеназы) участвуют в деградации коллагена базальной мембраны IV типа и потере эпителиальной организации в активной фазе ВЗК (7). Иммуногистохимические исследования показали, что эти ферменты присутствуют во внеклеточном матриксе субмукозы (3). В работе использованы кроличьи поликлональные АТ («Thermo Scientific», США).

Ki-67 – Маркер пролиферативной активности, который выявляется во всех стадиях клеточного цикла, кроме G0. Используются кроличьи АТ, клон SP6.

CD 68 – маркер моноцитов-макрофагов, гистиоцитов. Используются мышьиные АТ, клон KP1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Патогенез ВЗК обезьян, как и человека, не ясен. Скорее всего он многофакторный, включающий факторы среды и генетическую восприимчивость. Следует отметить отличия между ВЗК обезьян и человека. В ВЗК патологии человека выделяют два клинически и патоморфологически различных заболевания: болезнь Крона и язвенный колит, в то время как ВЗК обезьян содержит признаки обоих заболеваний человека. Заболевание типично начиналось с ухудшения аппетита, к которому вскоре присоединялась диарея, а вслед за тем потеря веса. С течением времени клиническая картина становилась все более грозной, появлялись (лихорадка, кишечные кровотечения), что и приводило животное к гибели.

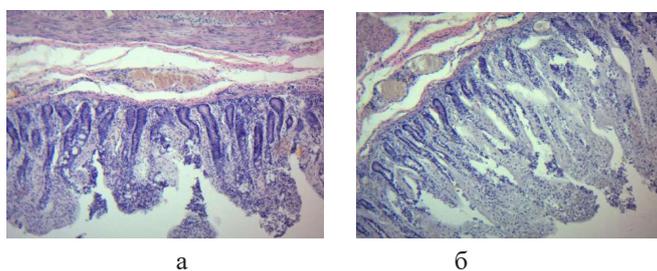


Рис. 1 (а, б). Гистопатологические изменения слизистой толстого кишечника при колите. ГЭ, ×100.

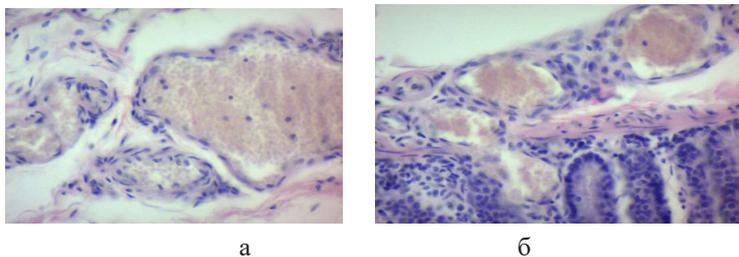


Рис. 2 (а, б). Гемостаз в зоне воспаления. ГЭ, ×400.

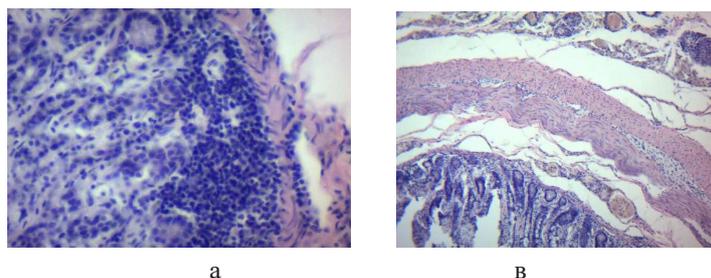


Рис. 3. (а) Фокальное скопление нейтрофилов в слизистой толстого кишечника. ГЭ, ×400. (в) Диффузная инфильтрация нейтрофилов в субмукозу. ГЭ, ×100.

При гистологическом изучении слизистой толстого кишечника здоровых животных наблюдается четкая, не поврежденная архитектура крипт с небольшим числом лейкоцитов в lamina propria. Исследование образцов ткани кишечника больных животных показало широкий спектр повреждений слизистой и подслизистой оболочек, укладывающиеся в картину интенсивного воспалительного процесса. Повреждения слизистой наблюдаются на всем протяжении кишеч-

ного тракта, однако в слизистой толстой кишки они выражены наиболее ярко. Воспалительный процесс проявляется отеком слизистой, который распространяется постепенно на все слои кишечной стенки, включая lamina propria (рис. 1), резко расширенными капиллярами слизистой, замедлением кровотока, признаками гемостаза (рис. 2).

Характернейшей чертой воспаления является миграция из сосудистого русла в зону воспаления

нейтрофилов, макрофагов и лимфоцитов, которые инфильтрируют и насыщают слизистую и подслизистую оболочки. Инфильтрация, как правило, достаточно равномерная, хотя иногда наблюдается и фокальная инвазия клеточных элементов (рис. 3).

Среди иммунных клеток доминируют гранулоциты, экспрессирующие МРО (рис. 4).

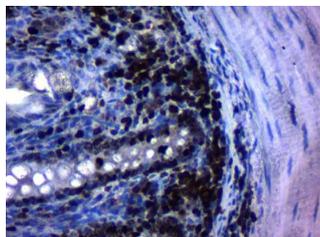


Рис. 4. Окраска на МРО, $\times 400$.

В больших количествах присутствуют также макрофаги/гистиоциты, несущие антиген CD68 (рис. 5).

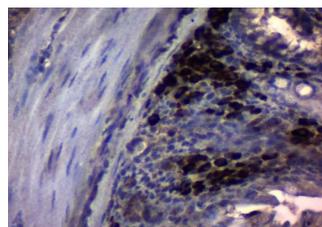


Рис. 5. Окраска на CD 68, $\times 400$.

В особенно тяжелых случаях можно наблюдать скопления нейтрофилов в просвете крипт и кишечника (абсцессы крипт), что свидетельствует о флегмонозном характере воспалительного процесса (рис. 6).

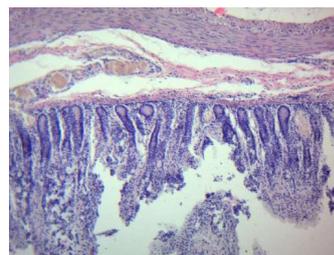
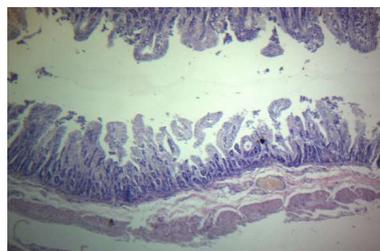
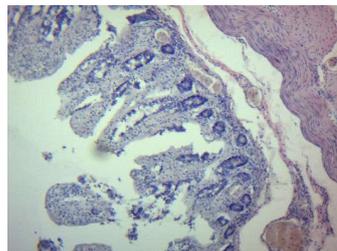


Рис. 6. Эрозии и флегмонозное воспаление мукозы и субмукозы. ГЭ, $\times 100$.

Уже на ранних стадиях воспаления начинается гибель энтероцитов и появляются очаги эрозии, которые вскоре сливаются в зону сплошного поражения (рис. 7).



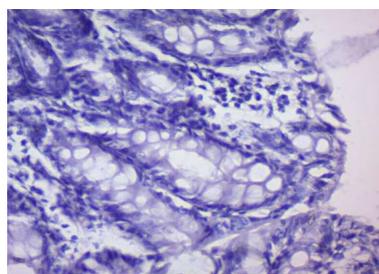
а



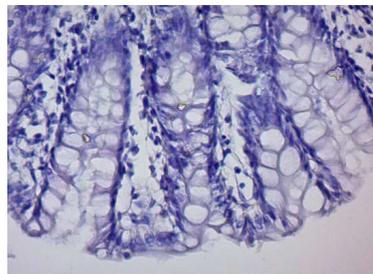
б

Рис. 7 (а, б). Разрушение и потеря крипт. ГЭ, $\times 100$.

Попутно наблюдаются признаки вакуольной дегенерации еще сохраняющихся энтероцитов (рис. 8).



а



б

Рис. 8 (а, б). Вакуолизация и гибель энтероцитов. ГЭ, $\times 400$.

Все это приводит к отслаиванию и потере крипт, в результате чего частично или полностью разрушается нормальная архитектура слизистой. Гибель эпи-

телиа и подлежащих структур вызывает высвобождение коллагеназы ММП-1, довершающей разрушение стенки кишечника (рис. 9).

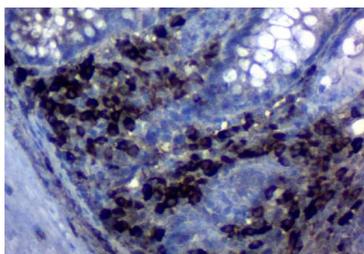


Рис. 9. Окрашивание на ММП-1, ×400.

Следствием этого является появление язв с возможными кишечными кровотечениями. В условиях летально заканчивающегося воспалительного процесса экспрессия маркеров пролиферативной активности незначительна (рис. 10).

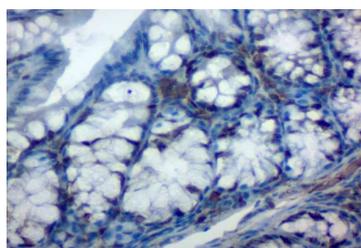


Рис. 10. Окрашивание на Ki-67, ×400.

ВЫВОДЫ

1. Хронический рекуррентный колит (энтероколит) явился причиной гибели 5 макак яванских и 3 макак резусов.

2. По результатам патоморфологического исследования патологический процесс начинается с миграции иммунцитов в lamina propria. На этапе выраженных клинических проявлений вся толстая кишка, а иногда и весь кишечник, вовлекаются в хронический воспалительный процесс, на который накладываются эпизоды острых обострений, которые включают массивную нейтрофильную инфильтрацию, абсцессы крипт, деплецию муцина и иногда появление язв. В нашем сообщении язвенный колит наблюдался у одного животного (10%). Хронический инфильтрат состоит из плазматических клеток, лимфоцитов и макрофагов. В конечном итоге значительная часть крипт разрушается, всасывание нарушается и животное погибает.

3. Не обнаружено видовых различий в патоморфологической картине ВЗК у макак двух видов. Макаки яванские и макаки резусы являются адекватной моделью аналогичного заболевания человека, изучение которой необходимо продолжить.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bager P. Anemia in inflammatory bowel diseases is much more than levels of hemoglobin. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*. 2015;24(2):145-146. doi: 10.15403/jgld.2014.1121.242.aninf.
2. Bahgat M. H., El-Etreby S. A. Bio-markers of inflammatory bowel disease: past, present, and future. *Austin Journal of Gastroenterology*. 2017;4(2):p.

1082. doi: 10.26420/austinjgastroenterol.2017.1082.
3. Day A. S., Ehn M., Geary R. B., Lemberg D. A., Leach S. T. Fecal S100A12 in healthy infants and children. *Disease Markers*. 2013;35(5):295-299. doi: 10.1155/2013/873582.
4. David JM, Dick EJ Jr, Hubbard GB. Spontaneous pathology of the common marmoset (*Callithrix jacchus*) and tamarins (*Saguinus oedipus*, *Saguinus mystax*). *J Med Primatol*. 2009;38(5):347-359. doi:10.1111/j.16000684.2009.00362.x
5. Demirkan A, Aksoy M, Kuzu MA. The effects of indomethacine on intestinal permeability and bacterial translocation in intestinal obstruction. *J. of Ankara University Faculty of Medicine* 2006; 59: 119-127.
6. Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*.1995;109(4):1344-67. doi:10.1016/00165085(95)905995.
7. Gao Q., Meijer M. J. W., Kubben F. J. G. M., et al. Expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 in intestinal tissue of patients with inflammatory bowel diseases. *Digestive and Liver Disease*. 2005;37(8):584-592. doi: 10.1016/j.dld.2005.02.011.
8. Gardner MB, Luciw PA. Macaque models of human infectious disease. *ILAR J*. 2008;49(2):220-255.
9. Gozalo A, Dagle GE, Montoya E, Weller RE. Spontaneous terminal ileitis resembling Crohn disease in captive tamarins. *JMed Primatol*. 2002;31(3):1426. doi:10.1034/j.16000684.2002.01002.x.
10. Gozalo AS, Cheng LI, St Claire ME, Ward JM, Elkins WR. Pathology of captive moustached tamarins (*Saguinus mystax*). *Comp Med*. 2008;58(2):188-195.
11. Hart A, Kamm MA. Review article: mechanisms of initiation and perpetuation of gut inflammation by stress. *Aliment Pharmacol Ther*. 2002;16(12):2017-2028.
12. Lin W. C., Chang C. W., Chen M. J., et al. Challenges in the diagnosis of ulcerative colitis with concomitant bacterial infections and chronic infectious colitis. *PLoS One*. 2017;12(12, article e0189377) doi: 10.1371/journal.pone.0189377.
13. Palmieri O., Creanza T. M., Bossa F., et al. Functional implications of microRNAs in Crohn's disease revealed by integrating microRNA and messenger RNA expression profiling. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(7) doi: 10.3390/ijms18071580.
14. Vatn M. H., Sandvik A. K. Inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2015;50(6):748-762. doi: 10.3109/00365521.2015.1033000.
15. Wood JD, Peck OC, Tefend KS, Stonerook MJ, Caniano DA, Mutabagani KH, et al. Evidence that colitis is initiated by environmental stress and sustained by fecal factors in the Cotton Top Tamarin (*Saguinus oedipus*). *Dig Dis Sci*. 2000;45(2):385-393. doi:10.1023/a:1005485215128.