

Э.Н. Федулова, Е.А. Жукова, О.А. Тутина, Т.А. Кузнецова, О.В. Шумилова, О.В. Фёдорова

Нижегородский НИИ детской гастроэнтерологии, Российская Федерация

Некоторые морфологические критерии прогнозирования степени тяжести течения болезни Крона у детей

Contacts:

Fedulova Jel'vira Nikolaevna, MD, Head of the Clinic of Pathology of Large Gut of Scientific Research Institute of Pediatric Gastroenterology of Nizhny Novgorod

Address: Semashko Street, 22, Nizhny Novgorod, RF, 603095, Tel.: (831) 436-67-06, e-mail: fedulova04@mail.ru

Article received: 19.07.2013, Accepted for publication: 28.10.2013

Цель исследования: выявить прогностические морфологические критерии осложненного течения болезни Крона у детей. **Пациенты и методы:** изучены морфометрические, гистологические показатели слизистой оболочки толстой кишки у 27 пациентов с толстокишечной локализацией болезни Крона при их первичной госпитализации. **Результаты:** наиболее информативными прогностическими морфологическими критериями неблагоприятного течения болезни оказались преобладание в собственной пластинке слизистой оболочки макрофагов в неактивной форме, стремящихся к объединению; наличие деструктивного васкулита; увеличение числа клеток фибробластического ряда с преимущественным обнаружением юных форм. Неактивные макрофаги и незрелые фибробласты в условиях тканевой гипоксии, связанной с наличием некротизирующего васкулита, являются факторами, способствующими развитию фиброза в слизистой оболочке толстой кишки. **Выводы:** обнаружены прогностически неблагоприятные морфологические критерии болезни Крона, позволяющие использовать более агрессивную лечебную тактику (схему «top-down») с ранним подключением гормональных, цитостатических и антицитокиновых препаратов для предотвращения развития осложнений в результате фиброзирования кишки.

Ключевые слова: болезнь Крона, дети, фибробласты.

(Вопросы современной педиатрии. 2013; 12 (5): 108–111)

ВВЕДЕНИЕ

Тяжесть течения хронических воспалительных заболеваний кишечника, к которым традиционно относят язвенный колит и болезнь Крона (БК), во многом обусловлена развивающимися необратимыми нарушениями структуры и функции желудочно-кишечного тракта, формированием осложнений заболевания, среди которых наиболее частое — развитие кишечного фиброза.

По данным Г. Адлера (2001), стриктуры кишечника обнаруживают у 30–50% пациентов с БК и у 7–11% больных язвенным колитом [1].

Фиброзные изменения в стенке кишечника определяют как избыточное отложение внеклеточного матрикса в результате хронического воспаления и нарушения реституции. В случае язвенного колита эти изменения происходят в слизистой оболочке и подслизистом слое, вызывая

E.N. Fedulova, E.A. Zhukova, O.A. Tutina, T.A. Kuznetsova, O.V. Shumilova, O.V. Fedorova

Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Pediatric Gastroenterology, Russian Federation

Morphological Criteria for Prediction of Severity of Crohn's Disease Clinical Course in Children

Aim: to establish prognostic morphological criteria of complicated clinical course of Crohn's disease in children. **Patients and methods:** morphometric and histological characteristics of the mucous membrane of the large intestine were studied in 27 patients with colitis form of Crohn's disease on their first admission to a hospital. **Results:** the most informative predictive morphological criteria for unfavorable prognosis were the following: predominance of the non-active macrophages tending to aggregation in the lamina propria mucosae; destructive vasculitis; increase in the number of fibroblastic cells with the prevalence of the young forms. Non-active macrophages and immature fibroblasts under hypoxia conditions, associated with necrotizing vasculitis, are the factors which contribute to development of fibrosis in the mucous membrane of the large intestine. **Conclusions:** unfavorable prognostic morphological criteria of Crohn's disease were determined. These criteria allow using more aggressive treatment management («top-down» scheme) with early administration of steroid, cytostatic and anti-cytokine drugs in order to prevent the development of complications due to intestinal fibrosis.

Key words: Crohn's disease, children, fibroblasts.

(Voprosy sovremennoy pediatrii — Current Pediatrics. 2013; 12 (5): 108–111)

утолщение мышечной оболочки с накоплением экстрацеллюлярного матрикса, что способствует укорочению и уплотнению стенки кишки. При БК трансмуральный характер воспалительного процесса приводит к уплотнению стенки кишки и в итоге к формированию стриктуры [2].

При язвенном колите хирургическое лечение по поводу стеноза кишечника проводят в единичных случаях, при БК это осложнение является основным показанием к операции [3, 4].

До 80% пациентов, страдающих БК, подвергаются оперативному вмешательству по крайней мере 1 раз в течение жизни [5]. У 1/2 больных основной причиной являются формирование стриктуры и обструкция кишечника [6]. Характерно, что в зоне анастомоза часто развивается рецидив болезни с повторным стенозированием кишечника [7].

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в последнее время в лечении хронических воспалительных заболеваний кишечника, которые позволяют контролировать воспалительный процесс, частота образования стриктур и стенозов за последние 25 лет существенно не изменилась [8]. Современная противовоспалительная терапия не способна повлиять на уже сформировавшиеся стриктуры [9, 10], что свидетельствует о важности прогнозирования течения болезни и предотвращения осложнений.

Для того чтобы разработать более эффективные терапевтические подходы, нужно лучшее понимание механизмов развития кишечного фиброза, что указывает на необходимость дополнительных исследований клеточных и молекулярных событий, лежащих в основе его патофизиологии [11].

В настоящее время основным механизмом, ответственным за развитие кишечного фиброза, считают увеличение численности постоянной популяции фибробластов. Установлено, что при БК фибробласты слизистой оболочки кишечника проявляют высокую сократительную активность, что может оказаться причиной возникновения стриктур [12].

Формирование грубых соединительнотканых волокон собственной пластинки слизистой оболочки осуществляется под влиянием ауто- и паракринных сигналов фибробластов и ассоциированных с ними клеток (макрофагов, тучных клеток, плазмоцитов) [13].

Цель исследования: осуществить поиск прогностических морфологических критериев осложненного течения болезни Крона у детей.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Участники исследования

Для оценки прогностической значимости морфологических признаков при осложненном течении БК были ретроспективно проанализированы колонобиоптаты 27 детей (15 мальчиков и 12 девочек) с толстокишечной локализацией процесса, взятые при их первичном обращении в стационар. Средний возраст пациентов на этот момент составил $10,5 \pm 1,3$ года. Сравнивали морфометрические результаты 15 детей с неосложненной (инфильтративной) формой БК и 12 — с осложненной (стенотической).

Методы исследования

Биоптаты были подвергнуты стандартной гистологической обработке с получением парафиновых срезов толщиной 5 мкм, окрашенных гематоксилином и эозином, альциановым синим и реактивом Шиффа. Морфометрический анализ клеток стромы и инфильтрата проводили с использованием сетки Г.Г. Автандилова.

Статистическая обработка данных

Статистический анализ проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica v. 6.0. Описательная статистика включала медиану (Me), интерквартильный размах [Q25–Q75], который независимо от вида распределения включает 50% значений признака в выборке, а также отношение рисков (ОР) и их доверительный интервал (ДИ). Для сравнения показателей использовали непараметрические методы (тесты Манна–Уитни, точный Фишера). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$ [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфометрические показатели биоптатов толстой кишки, ретроспективно проанализированные у детей с разными вариантами течения БК при первичной госпитализации, позволили с точки зрения доказательной медицины подтвердить наличие прогностических морфологических критериев развития осложнений. Установлено, что еще в начале болезни, в период до развернутой клинической картины и развития осложнений, имелись значительные различия при морфометрическом анализе колонобиоптатов (табл. 1). Так, в группе детей с осложненным течением заболевания клеточная плотность инфильтрата была значительно выше. В инфильтрате при этой форме достоверно преобладали лимфоциты, плазмоциты и нейтрофильные гранулоциты. В собственной пластинке слизистой оболочки при осложненном течении БК уже на начальном периоде болезни отмечалось уменьшение числа сосудов микроциркуляторного русла (206 [188–234], 498 [401–524]; $p = 0,004$), что в значительной степени нарушало трофику слизистой оболочки и ее репаративную способность. Обнаружено, что при неблагоприятном варианте БК, помимо меньшего числа сосудов микроциркуляторного русла, в значительном проценте случаев выявляется деструктивный васкулит (у 83,3% пациентов против 13,3%; $p = 0,0003$; рис. 1). Этот факт проясняет механизм развития осложнений в условиях нарушения кровоснабжения поврежденных тканей (ОР 6,3; 95% ДИ 3,8–10,4).

Гистологические показатели слизистой оболочки толстой кишки с оценкой рисков в отношении развития осложненных форм БК представлены в табл. 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%; $p = 0,03$), что повышает риск развития осложнений в 2,2 раза (95% ДИ 1,7–3,0).

Важно, что при неблагоприятном прогнозе отмечалась высокая фибропластическая активность с большей долей функционально незрелых фибробластов (в 83,3%

Таблица 1. Морфометрические показатели слизистой оболочки толстой кишки при осложненном и неосложненном варианте течения болезни Крона при первичной госпитализации

Показатель	Варианты болезни Крона		p
	Неосложненный Медиана [Q25–Q75], n = 15	Осложненный Медиана [Q25–Q75], n = 12	
Клеточная плотность под эпителием, на 1 мм ²	10 227 [9709–10746]	12 326 [11928–706]	0,004
Клеточная плотность в основании крипт, на 1 мм ²	10 558 [10275–10841]	13 789 [13292–188]	0,004
Фибробласты стромы, на 1 мм ²	1935 [1549–2321]	2415 [2047–2784]	0,023
Фиброциты стромы, на 1 мм ²	1308 [10067–1610]	1912 [1544–2278]	0,023
Макрофаги стромы, на 1 мм ²	492 [444–542]	390 [360–437]	0,004
Тучные клетки стромы, на 1 мм ²	377 [331–424]	351 [305–396]	0,332
Лимфоциты инфильтрата, на 1 мм ²	2953 [2642–3265]	4206 [3809–4603]	0,004
Плазмоциты инфильтрата, на 1 мм ²	2695 [2294–3096]	3551 [3159–3944]	0,004
Эозинофильные гранулоциты инфильтрата, на 1 мм ²	492 [442–542]	519 [467–574]	0,332
Нейтрофильные гранулоциты инфильтрата, на 1 мм ²	310 [258–362]	398 [347–451]	0,023
Капилляры, на 1 мм ²	498 [401–524]	206 [188–234]	0,004

Примечание. [Q25–Q75] — интерквартильный размах. n — число детей, p — статистическая значимость. Полужирным шрифтом выделены значимые различия.

Таблица 2. Частота обнаружения основных прогностических гистологических критериев болезни Крона у детей

Гистологический признак		Неосложненный вариант болезни Крона, n = 15		Осложненный вариант болезни Крона, n = 12		p	ОР	ДИ
		Абс.	%	Абс.	%			
Клеточная плотность в глубоком отделе собственной пластинки слизистой оболочки 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 в собственной пластинке слизистой оболочки	есть	3	20	10	83,3	0,001	4,2	2,8–6,2
	нет	12	80	2	16,7			
В собственной пластинке слизистой оболочки преобладают неактивные макрофаги	есть	2	13,3	11	91,7	0,0001	6,9	4,2–11,4
	нет	13	86,7	1	8,3			

Примечание. n — число детей, p — статистическая значимость, ОР — отношение рисков развития осложненного и неосложненного варианта болезни, ДИ — доверительный интервал отношения рисков. Полужирным шрифтом выделены значимые различия.

Рис. 1. Некротизирующий васкулит (стрелка) при осложненном течении болезни Крона. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 1×400

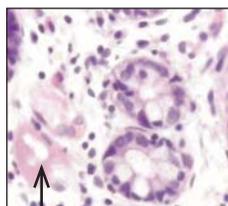


Рис. 2. Скопления юных фибробластов. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 10×100

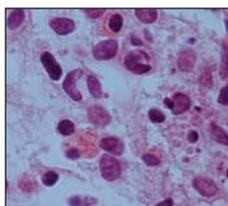


Рис. 3. Активные макрофаги (стрелки) при неосложненном течении болезни Крона. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 10×100



Рис. 4. Неактивные макрофаги, стремящиеся к слиянию (стрелки) при осложненном течении болезни Крона. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 1×100

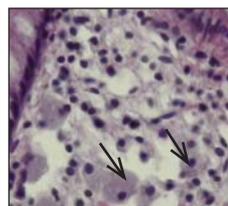
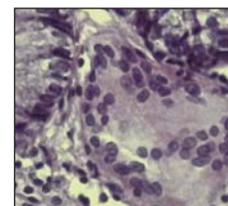


Рис. 5. Образование многоядерной гигантской клетки (эпителиодной гранулемы) при осложненном течении болезни Крона. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 1×100



случаев против 20%; $p = 0,001$; рис. 2). Это свидетельствует об активном фибротическом процессе, который может быть предшественником развития осложнений болезни (стеноз, стриктура) (ОР 4,2; 95% ДИ 2,8–6,2). Если при неосложненном течении макрофаги были преимущественно активными, нагруженными лизосомами (рис. 3), то при развитии стеноза макрофаги в собственной пластинке слизистой оболочки находились преимущественно в неактивной форме (у 91,7% пациентов против 13,3%; $p = 0,0001$; рис. 4) (ОР 6,9; 95% ДИ 4,2–11,4). Кроме того, у детей с осложненным течением БК имел место феномен группировки неактивных макрофагов между собой с формированием многоядерных клеток, являющихся предшественниками многоядерных гранулем по типу Пирогова–Лангханса (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

В связи с тем, что основным источником фиброгенеза являются фибробласты [12, 13], не только их численность и морфологические особенности (преобладание незрелых форм) влияют на разрастание соединительнотканых элементов в собственной пластинке слизистой оболочки и, как следствие, на развитие осложнений. Большое значение имеет также состояние клеточного окружения, особенно макрофагальное. До настоящего времени их влияние на активность фибробластов было неоднозначным [15]. Нами показано, что скопление неактивных макрофагов на фоне некротизирующего васкулита, создающего состояние гипоксии в очаге воспаления, приводит к увеличению числа незрелых фибробластов. В совокупности эти факторы вызывают гиперпродукцию коллагена при снижении

активности коллагеназ и свидетельствуют о несбалансированности репарации соединительной ткани в собственной пластинке слизистой оболочки и развитии склеротических процессов. Полученные данные подтверждают представление о совокупном влиянии функционального состояния макрофагов и фибробластов на фиброгенез [16].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У детей с болезнью Крона уже при первичной госпитализации можно определить морфологические признаки, позволяющие прогнозировать осложненное течение заболевания. Наиболее информативными критериями неблагоприятного течения являются: нахождение в собственной пластинке слизистой оболочки макрофагов в неактивной форме, стремящихся к объединению; состояние микроциркуляторного русла, характеризующееся наличием деструктивного васкулита; увеличение числа клеток фибробластического ряда с преимущественным обнаружением юных фибробластов.

Морфологическое исследование позволяет не только оценить активность воспалительного процесса в кишечнике при воспалительных заболеваниях кишечника, но и прогнозировать течение заболевания, а также определять долгосрочную тактику ведения больного. Так, при обнаружении прогностически неблагоприятных морфологических критериев необходимо использовать более агрессивную лечебную тактику (схему «top-down») с ранним подключением гормональных, цитостатических и антицитокиновых препаратов с целью предотвращения развития осложнений в результате фиброзирования кишки.

REFERENCES

- Adler G. *Bolezn' Krona i yazvennyi kolit* [Crohn's disease and ulcerative colitis]. M.: GEOTAR-Med. 2001. 500 p.
- Burke J.P., Mulsow J.J., O'Keane C. et al. Fibrogenesis in Crohn's disease. *Am. J. Gastroenterol.* 2007; 102: 439–448.
- Longo W.E., Virgo K.S., Bahadursingh A.N., Johnson F.E. Patterns of disease and surgical treatment among United States veterans more than 50 years of age with ulcerative colitis. *Am. J. Surg.* 2003; 186: 514–518.
- Prudhomme M., Dozois R.R., Godlewski G. et al. Anal canal strictures after ileal pouch-anal anastomosis. *Dis. Colon Rectum.* 2003; 46: 20–23.
- Farmer R.G., Whelan G., Fazio V.W. Long-term follow-up of patients with Crohn's disease. Relationship between the clinical pattern and prognosis. *Gastroenterology.* 1985; 88: 1818–1825.
- Silverstein M.D., Loftus E.V., Sandborn W.J. et al. Clinical course and costs of care for Crohn's disease: Markov model analysis of a population-based cohort. *Gastroenterology.* 1999; 117: 49–57.
- Rutgeerts P., Geboes K., Vantrappen G. et al. Predictability of the postoperative course of Crohn's disease. *Gastroenterology.* 1990; 99: 956–963.
- Baranov A.A., Potapov A.S., Cimbalo E.G. *Vestnik RAMN — Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2011; 6: 36–41.
- Cimbalo E.G., Potapov A.S., Shavrov A.A. *Voprosi sovremennoi pediatrii — Current Pediatrics.* 2012; 11 (1): 135–142.
- Sorrentino D., Terrosu G., Vadala S., Avellini C. Fibrotic strictures and anti-TNF-alpha therapy in Crohn's disease. *Digestion.* 2007; 75: 22–24.
- Lichtenstein G.R., Olson A., Travers S. et al. Factors associated with the development of intestinal strictures or obstructions in patients with Crohn's disease. *Am. J. Gastroenterol.* 2006; 101: 1030–1038.
- Regan M.C., Flavin B.M., Fitzpatrick J.M., O'Connell P.R. Stricture formation in Crohn's disease: the role of intestinal fibroblasts. *Ann. Surg.* 2000; 231 (1): 46–50.
- Lawrance I.C., Maxwell L., Doe W. Altered response of intestinal mucosal fibroblasts to profibrogenic cytokines in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bow. Dis.* 2001; 7 (3): 226–236.
- Rebrova O.Ju. *Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA* [Application Program Package STATISTICA]. Moscow, MediaSfera, 2002. 312 p.
- Ivanova A.S., Jur'eva Je.A., Dlin V.V. *Fibrozirujushhie process* [Fibrotic Processes]. Moscow, Overlej, 2008. 196 p.
- Majanskij D.N. *Hronicheskoe vospalenie* [Chronic Inflammation]. Moscow, Medicina, 1991. 272 p.