

ЗМІНИ СЛИЗОВОГО БАР'ЄРУ У ПАЦІЄНТІВ ІЗ СИНДРОМОМ ПОДРАЗНЕНОГО КИШЕЧНИКА

А. Е. Дорофєєв, О. О. Дядик, В. М. Приходько

Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика

Синдром подразненого кишечника є одним із найпоширеніших захворювань шлунково-кишкового тракту. Вплив на формування його екзогенних та ендогенних факторів мікрозапалення, порушення роботи слизового бар'єру кишечника робить дану патологію актуальною саме для патоморфологічного дослідження. В даній роботі розглянуто зміни в експресії білків щільних контактів ентероцитів – клаудинів-1 і клаудинів-7 у залежності від превалюючих симптомів у пацієнтів із синдромом подразненого кишечника.

Ключові слова: слизовий бар'єр кишечника, функціональні розлади кишечника, синдром подразненого кишечника, тісні контакти, клаудин.

CHANGES IN THE MUCOSAL BARRIER IN PATIENTS WITH IRRITABLE BOWEL SYNDROME

A. E. Dorofeyev, O. O. Dyadyk, V. M. Prykhodko

Shupyk National Healthcare University of Ukraine

Background. The intestinal mucosal barrier may change under the influence of exogenous and endogenous factors. Changes in its physical and chemical characteristics are observed in patients with gastrointestinal diseases, such as irritable bowel syndrome, and with other pathologies, such as diabetes mellitus, food allergies, rheumatoid arthritis, etc. Also, the permeability of the intestinal wall was influenced by tight junctions, which are weakened due to eating disorders, psycho-emotional factors, and chemical agents. The purpose of the study was evaluating of changes in the mucosal barrier in patients with functional bowel diseases.

Materials and methods. 90 patients with different subtypes of irritable bowel syndrome were examined. Colonoscopy followed by a morphological assessment of biopsy specimens and immunohisto-chemical studies using markers of claudin 1 and claudin 7.

Results. A decrease in the level of tight junction proteins called claudins was observed in patients with functional bowel disease. Patients with irritable bowel syndrome associated with diarrhea had a lower level of claudin-1 only, while patients with mixed form had also a lower level of claudin-7.

Conclusions. The pathogenesis of a violation of the protective function of the mucosa of functional and inflammatory bowel disease is different, which may determine approaches to the treatment of patients with such pathologies.

Keywords: mucosal barrier of the bowel; functional bowel disease; irritable bowel syndrome; tight junction; claudin.

Вступ. Синдром подразненого кишечника – одна з найбільш поширених патологій травної системи. Основою його виникнення можна виділити збої у взаємодії роботи мозку та кишечника, що в свою чергу, визначає цю проблему як психофізіологічну. Однак відсутність органічних змін у слизовій оболонці травного тракту при синдромі подразненого кишечника не покращує епідеміологічну ситуацію, тому кількість звернень пацієнтів до закладів охорони здоров'я з приводу даної патології залишається високою, що визначає необхідність її детального дослідження. Дослідники визначають низку факторів, що впливають на розвиток синдрому подразненого кишечника. До них відносяться як соціо-культурні чинники, такі як соціальне

середовище, генетичні фактори, стреси, так і фізіологічні – порушення моторики, імунний дисбаланс, порушення харчування, мікрозапалення, зміни кишкової мікробіоти. Майже всі зазначені чинники прямо чи опосередковано пов'язані зі станом слизового бар'єру кишечника [1-6].

Слизовий бар'єр кишечника є комплексною структурою, що відповідає за гомеостаз як безпосередньо самого кишечника, так і організму в цілому. Для його нормального функціонування необхідна адекватна робота імунної системи, клітин слизової оболонки кишечника, а також правильне співвідношення облігатної та патогенної мікрофлори. Порушення захисної функції слизового бар'єру з підвищенням проникності кишкової стінки асоційовано

не лише з захворюваннями шлунково-кишкового тракту, а й із рядом хронічних соматичних і психічних захворювань, таких як діабет, ревматоїдний артрит, шизофренія та інші [7, 9].

Якщо розглядати функціональну патологію кишечника, то одним із основних патогенетичних факторів є формування мікрозапалення та феномену вісцеральної гіперчутливості. Найбільш яскраво такі зміни проявляються при постінфекційних порушеннях, що підтверджує важливу роль мікробіологічної складової у формуванні захисної функції слизового бар'єру кишечника [7].

Важливою ланкою патогенезу розвитку функціональних розладів кишечника є порушення цілісності щільних контактів ентероцитів, що є основою нормального функціонування слизового бар'єру кишечника. Їх порушення можуть спровокувати безліч факторів, як зовнішніх – порушення дієти, потрапляння екзогенних інфекційних агентів, так і внутрішніх – імунні реакції із вивільненням прозапальних цитокінів. Важливим у дослідженні даних змін є наявність маркерів, що якісно та кількісно пов'язані з порушенням щільних контактів і стану слизового бар'єру кишечника [5, 8, 10].

Мета дослідження: комплексне патоморфологічне оцінювання слизового бар'єру у пацієнтів із синдромом подразненого кишечника шляхом імуногістохімічного дослідження білків щільних контактів.

Матеріал і методи дослідження. Обстежено 90 пацієнтів із різними підтипами синдрому подразненого кишечника (СПК). Усім пацієнтам проводилась колоноскопія з біопсією. При мор-

фологічному оцінюванні біоптатів проводилось стандартне забарвлення гематоксиліном-еозином та імуногістохімічне дослідження з використанням маркерів клаудину-1 та клаудину-7.

Патоморфологічне дослідження біоптатів товстого кишечника проведено на кафедрі патологічної та топографічної анатомії НУОЗ України імені П. Л. Шупика. Отримані біоптати фіксували в 10 % розчині нейтрального забуференого формаліну протягом 24-48 годин. Після фіксування матеріалу проводили стандартну проводку в апараті Excelsior AS, потім заливали в парафін на апараті HistoStar. Із парафінових блоків на ротаційному мікротомі НМ 325 виготовляли серійні гістологічні зрізи товщиною 2-3 мкм. Зрізи забарвлювали гематоксиліном та еозином, для визначення стану щільних контактів/з'єднань проміж клітинами епітелію проведено імуногістохімічне дослідження (ІГХД) із білками сімейства щільних контактів клаудин-1 (claudin-1) та клаудин-7 (claudin-7). Зрізи поміщалися на адгезивні скельця Super Frost Plus. Для високотемпературної обробки епітопів антигенів застосовували цитратний буфер із рН6, EDTA буфер, рН8. Використано кролячі поліклональні антитіла до клаудину-1 та клаудину-7, а також систему детекції Master Polymer Plus Detection (Peroxidase, хромоген ДАБ).

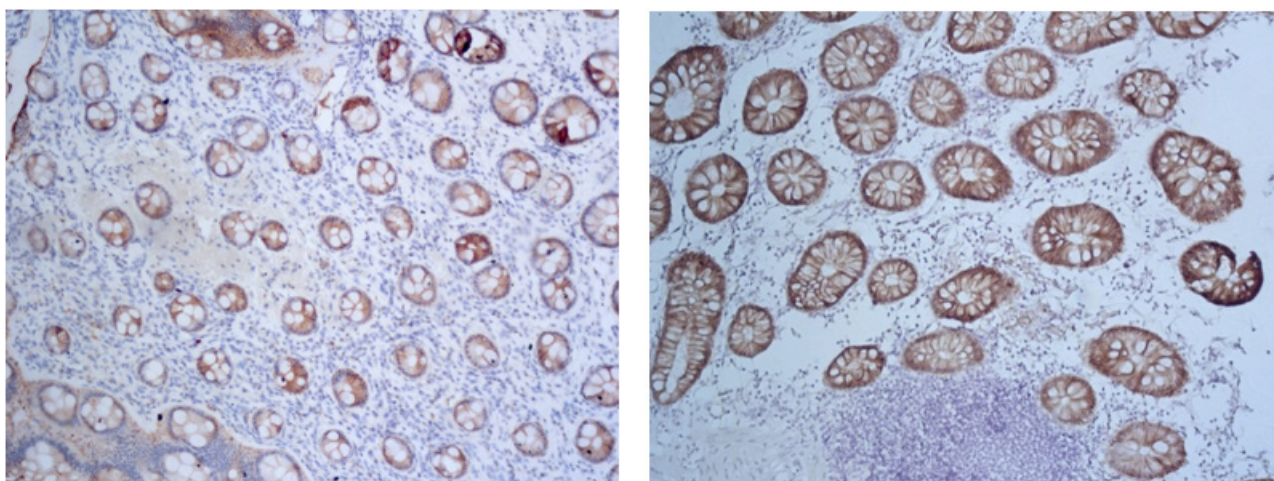
Для оцінювання ступеня експресії клаудину нами застосовано два напівкількісних методи, що вказували на кількість клітин, які прореагували з маркером. Останнє дозволило об'єктивізувати отримані данні, що представлено в табл. 1 за критерієм H- score [11-14].

Таблиця 1

Оцінка експресії клаудину за методикою G. Sheehan (2007 р.)

Інтенсивність забарвлення	Бал за інтенсивністю забарвлення/ локалізація в епітелії*	Кількість позитивних клітин	Бал за кількістю позитивних клітин	Сума балів
слабка	1/ +1	До 25%	1	0**-3 - слабка
помірна	2/ +2	25-50%	2	4-6 - помірна
виражена	3/ +3	Від 51%	3	7-9 - виражена

Примітки: * - локалізація в епітелії – в поверхневих відділах, в інших відділах; ** - 0 – реакція відсутня



А

В

Рис. 1. Слизова оболонка товстого кишечника, позитивна експресія клаудину-7; А – пацієнт із СПК змішаної форми, Б – пацієнт із СПК із закрепом. ІГХД із поліклональним антитілом до клаудину-7, збільшення x100

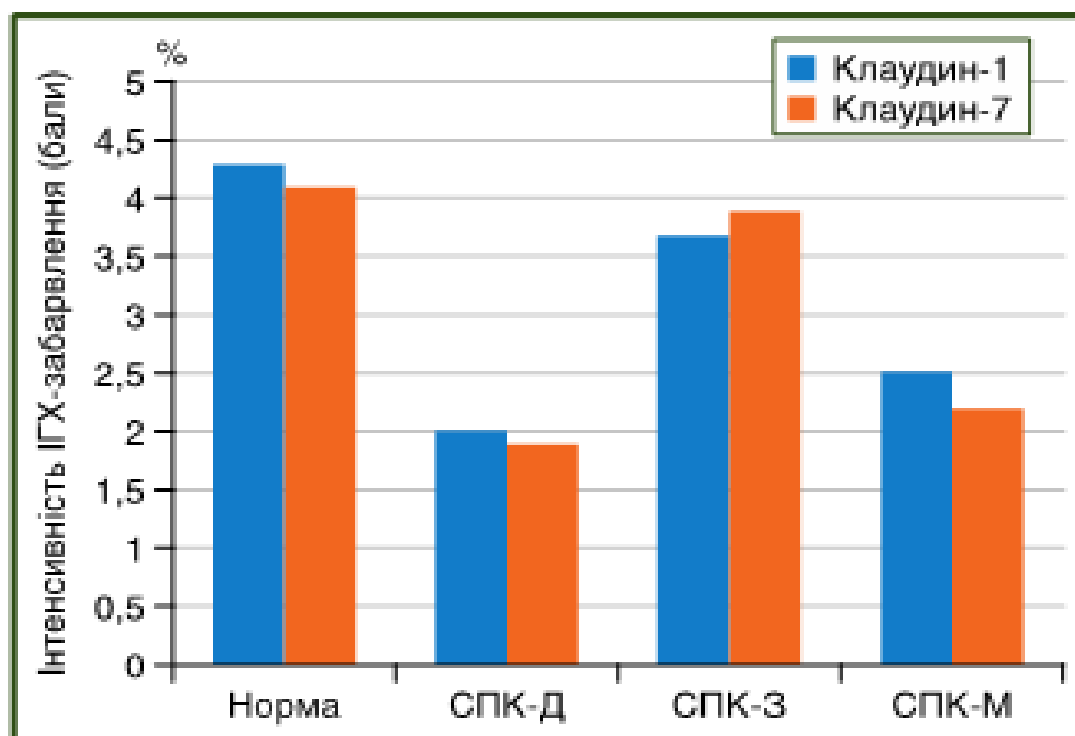


Рис. 2. Інтенсивність ІГХ-забарвлення клаудином-1 та клаудином-7 при різних формах СПК

Експресія клаудину за критерієм H-score (Shibutani M., 2014, Suren D., 2014):

0 – Експресія відсутня;

1 – Експресія наявна менше ніж у 1/3 поверхні мембран;

2 – Експресія наявна від 1/3 до 2/3 поверхні мембран;

3 – Експресія наявна більше ніж у 2/3 поверхні мембран.

Результати та їх обговорення. У пацієнтів із синдромом подразненого кишечника, у порівнянні зі здоровими, характерними змінами було зниження експресії білків щільних контактів – клаудинів, у біоптатах слизової оболонки різних відділів товстої кишки. При цьому порівняльний аналіз профілю експресії білків щільних контактів між підтипами захворювання виявив вірогідне зниження експресії клаудину-1 у пацієнтів із СПК, асоційованим із діареєю (СПК-Д), що не спостерігалось при інших підтипах СПК (2,00±0,17) бала при нормі (2,81±0,11) бала [10, 11]. У той же час, за нашими даними, відмічається зменшен-

ня експресії клаудину-7 не тільки у пацієнтів із СПК-Д, але й у пацієнтів із змішаною формою СПК (СПК-М) (рис. 1) ((1,91±0,17) бала та (2,23±0,21) бала відповідно, при нормі (2,89±0,10) бала. Окрім цього, існує кореляція між зазначеними змінами та активацією тучних клітин у слизовій оболонці кишечника. При їх дегрануляції виділяються біологічно активні речовини такі, як гістамін, серинові протеази та серотонін, що зв'язуються з рецепторами аферентних нейронів та, викликаючи їх сенсibiлізацію, створюють феномен вісцеральної гіперчутливості [15].

Висновки. Отримані дані дозволяють стверджувати, що стан слизового бар'єр кишечника у пацієнтів із СПК суттєво змінюється. Такі зміни впливають на особливості перебігу захворювання. Одним із маркерів структурних змін слизового бар'єру в пацієнтів із синдромом подразненого кишечника є зміни експресії білків щільних контактів, а саме клаудину-7, що є важливим патогенетичним чинником виникнення та розвитку СПК.

Література.

1. Colonic immune cells in irritable bowel syndrome: A systematic review and meta-analysis / M. Bashashati, S. Moosavi, C. Cremon et al. // *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society.* – 2017. – № 30.
2. Pharmacological, Pharmacokinetic, and Pharmacogenomic Aspects of Functional Gastrointestinal Disorders / M. Camilleri, L. Bueno, V. Andresen et al. // *Gastroenterology.* – 2016. – № 150. – С. 1319-1331.
3. Treatment Interventions for the Management of Intestinal Permeability: A Cross-Sectional Survey of Complementary and Integrative Medicine Practitioners / B. Leech, J. Schloss, A. Steel // *Journal of alternative and complementary medicine.* – 2019. – № 25(6). – С. 623-636.
4. Abnormal Barrier Function in Gastrointestinal Disorders / R. Farré, M. Vicario // *Handbook of experimental pharmacology.* – 2017. – № 239. – С. 193-217.
5. Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates / C. Zihni, C. Mills, K. Matter, M. Balda. // *Nature reviews. Molecular cell biology.* – 2016. – № 17(9). – С. 564-580.
6. New treatments and therapeutic targets for IBS and other functional bowel disorders / M. Simrén, J. Tack

// *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology.* – 2018. – № 15(10). – С. 589-605.

7. Dysbiosis in Functional Bowel Disorders / P. Enck, N. Mazurak // *Annals of nutrition & metabolism.* – 2018. – № 72(4). – С. 296-306.

8. The Claudins: From Tight Junctions to Biological Systems / S. Tsukita, H. Tanaka, A. Tamura // *Trends in biochemical sciences.* – 2019. – № 44(2). – С. 141-152.

9. Regulation of the intestinal barrier by nutrients: The role of tight junctions / T. Suzuki // *Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho.* – 2020. – № 91(1).

10. The mechanobiology of tight junctions / S. Citi // *Biophysical reviews.* – 2019. – № 11(5). – С. 783-793.

11. Claudin expression in high-grade invasive ductal carcinoma of the breast: correlation with the molecular subtype / Lu S., Singh K., Mangray S. et al. // *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology.* – 2013. – № 26(4). – С. 485-495.

12. Low expression of claudin-1 and presence of poorly-differentiated tumor clusters correlate with poor prognosis in colorectal cancer / Shibutani M., Noda E., Maeda K. et al. // *Anticancer research.* – 2013. – № 33(8). – С. 3301-3306.

13. Loss of tight junction proteins (Claudin 1, 4, and 7) correlates with aggressive behavior in colorectal carcinoma / Süren D., Yıldırım M., Kaya V. et al. // *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. – 2014. – № 20. – С. 1255-1262.

14. Loss of claudin-1 expression induces epithelial-mesenchymal transition through nuclear factor- κ B activation in colorectal cancer / Kim N. Y., Pyo J. S.,

Kang et al. // *Pathology, research and practice*. – 2019. – № 215(3). – С. 580-585.

15. Mast cells are increased in the small intestinal mucosa of patients with irritable bowel syndrome: A systematic review and meta-analysis / A. Robles, D. Perez Ingles, K. Myneedu et al. // *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*. – 2019. – № 31(12).

References.

1. Bashashati, M., Moossavi, S., Cremon, C., Barbaro, M. R., Moraveji, S., Talmon, G., Rezaei, N., Hughes, P. A., Bian, Z. X., Choi, C. H., Lee, O. Y., Coëffier, M., Chang, L., Ohman, L., Schmulson, M. J., McCallum, R. W., Simren, M., Sharkey, K. A., Barbara, G. (2018). Colonic immune cells in irritable bowel syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 30(1). DOI: 10.1111/nmo.13192.

2. Camilleri, M., Bueno, L., de Ponti, F., Fioramonti, J., Lydiard, R. B., Tack, J. (2006). Pharmacological and pharmacokinetic aspects of functional gastrointestinal disorders. *Gastroenterology*, 130(5), 1421-1434. DOI: 10.1053/j.gastro.2005.08.062.

3. Leech, B., Schloss, J., Steel, A. (2019). Treatment Interventions for the Management of Intestinal Permeability: A Cross-Sectional Survey of Complementary and Integrative Medicine Practitioners. *Journal of alternative and complementary medicine (New York, N.Y.)*, 25(6), 623-636. DOI: 10.1089/acm.2018.0374.

4. Farré, R., Vicario, M. (2017). Abnormal Barrier Function in Gastrointestinal Disorders. *Handbook of experimental pharmacology*. 239, 193-217. DOI: 10.1007/164_2016_107.

5. Zihni, C., Mills, C., Matter, K., Balda, M. S. (2016). Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 17(9), 564-580. DOI: 10.1038/nrm.2016.80.

6. Simrén, M., Tack, J. (2018). New treatments and therapeutic targets for IBS and other functional bowel disorders. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*. 15(10), 589-605. DOI: 10.1038/s41575-018-0034-5.

7. Enck, P., Mazurak, N. (2018). Dysbiosis in Functional Bowel Disorders. *Annals of nutrition & metabolism*. 72(4), 296-306. DOI: 10.1159/000488773.

8. Tsukita, S., Tanaka, H., Tamura, A. (2019). The Claudins: From Tight Junctions to Biological Systems. *Trends in biochemical sciences*. 44(2), 141-152. DOI: 10.1016/j.tibs.2018.09.008.

9. Suzuki, T. (2020). Regulation of the intestinal barrier by nutrients: The role of tight junctions. *Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho*. 91(1), e13357. DOI: 10.1111/asj.13357.

10. Citi, S. (2019). The mechanobiology of tight junctions. *Biophysical reviews*. 11(5), 783-793. DOI: 10.1007/s12551-019-00582-7.

11. Lu, S., Singh, K., Mangray, S., Tavares, R., Noble, L., Resnick, M. B., Yakirevich, E. (2013). Claudin expression in high-grade invasive ductal carcinoma of the breast: correlation with the molecular subtype. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 26(4), 485-495. DOI: 10.1038/modpathol.2012.187.

12. Shibutani, M., Noda, E., Maeda, K., Nagahara, H., Ohtani, H., Hirakawa, K. (2013). Low expression of claudin-1 and presence of poorly-differentiated tumor clusters correlate with poor prognosis in colorectal cancer. *Anticancer research*. 33(8), 3301-3306.

13. Süren, D., Yıldırım, M., Kaya, V., Alikanoğlu, A. S., Bülbüller, N., Yıldız, M., Sezer, C. (2014). Loss of tight junction proteins (Claudin 1, 4, and 7) correlates with aggressive behavior in colorectal carcinoma. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*. 20, 1255-1262. DOI: 10.12659/MSM.890598.

14. Kim, N. Y., Pyo, J. S., Kang, D. W., Yoo, S. M. (2019). Loss of claudin-1 expression induces epithelial-mesenchymal transition through nuclear factor- κ B activation in colorectal cancer. *Pathology, research and practice*. 215(3), 580-585. DOI: 10.1016/j.prp.2019.01.015.

15. Robles, A., Perez Ingles, D., Mynedu, K., Deoker, A., Sarosiek, I., Zuckerman, M. J., Schmulson, M. J., Bashashati, M. (2019). Mast cells are increased in the small intestinal mucosa of patients with irritable bowel syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*. 31(12), e13718. DOI: 10.1111/nmo.13718.

ORCID:

Andriy E. Dorofeyev: 0000-0002-2631-8733

Olena O. Dyadyk: 0000-0002-9912-4286

Veronika M. Prykhodko: 0000-0003-2021-5650