

Морфофункциональное состояние апудоцитов желудка у больных сахарным диабетом 2 типа

А.М. Мкртумян, И.В. Маев, К.И. Баирова

Московский государственный медико-стоматологический университет, Москва
(ректор — д.м.н., проф. О.О. Янушевич)

Цель исследования. Изучить содержание гастроинтестинальных гормонов в плазме крови, морфофункциональное состояние G- и D-клеток у пациентов с патологией желудка в сочетании с сахарным диабетом 2 типа (СД2).

Материалы и методы. Под наблюдением находились 84 пациента (46 — с СД2) с язвенной болезнью желудка (ЯБЖ) и хроническим гастритом (ХГ). Для полуколичественной оценки степени инфицированности *H.pylori* желудка применяли гистологический метод. Подсчет подкрашенных G- и D-клеток осуществляли при увеличении в 400 раз в 10 полях зрения каждого из препаратов. Хромогранин А, соматостатин и гастрин исследовали иммуногистохимически. Определение гастрин-17 и соматостатина-14 производили иммуноферментным анализом. Контрольную группу составили 10 практически здоровых добровольцев.

Результаты. При сочетании ЯБЖ или ХГ с СД 2 по сравнению с изолированной патологией желудка отмечено уменьшение количественной плотности G- и D-клеток, снижение уровня гастрин и соматостатина ($p < 0,05$). В биоптатах больных СД2, инфицированных *H.pylori*, увеличена плотность G-клеток ($p < 0,05$) и уменьшена плотность D-клеток ($p < 0,05$) по сравнению с группой неинфицированных больных. Количество гастрин-иммунопозитивных клеток у больных СД 2 с патологией желудка было достоверно больше при второй степени инфицированности, меньше — при третьей степени инфицированности. Количество эндокринных клеток слизистой оболочки желудка (СОЖ) меньше у больных СД2 по сравнению с контрольной группой (23% и 56% соответственно, $p < 0,05$). При длительности СД2 более 10 лет значимо снижается плотность эпителиоцитов желудка.

Заключение. Метаболические нарушения, локальные нарушения трофики, ускорение экстррузии эпителиоцитов, колонизация *H.pylori*, нарушение регенерации у больных СД2 приводят к атрофии СОЖ с нарушением количества и соотношения G- и D-клеток.

Ключевые слова: апудоциты, цитокины, гастрит, язвенная болезнь желудка, соматостатин

Mkrtumyan A.M., Maev I.V., Bairova K.I.

Morphofunctional characteristic of gastric adipocytes in patients with type 2 diabetes mellitus

Aim. To measure gastrointestinal hormones in plasma, evaluate morphofunctional state of G- and D-cells in patients with gastric pathology and concomitant type 2 diabetes mellitus (DM2).

Materials and methods. A total of 84 patients with gastric ulcer (GU) and chronic gastritis (CG) were available for observation including 46 with DM2. Semi-quantitative evaluation of stomach infection by *H.pylori* was performed by a histological method. Stained G- and D-cells were counted under 400x magnification in 10 fields of vision for each medicinal preparation used in the study. Chromogranin A, somatostatin, and gastrin were detected by immunohistochemical methods, gastrin-17 and somatostatin-14 by the respective immunoassays. Control group comprised 10 practically healthy volunteers.

Results. Patients with combined GU (or CG) and DM2 pathology had smaller density of G- and D-cells, lower plasma gastrin and somatostatin levels than those without DM2 ($p < 0.05$). Biopsies from DM2 patients infected with *H.pylori* showed higher density of G-cells ($p < 0.05$) and lower density of D-cells ($p < 0.05$) than those from non-infected ones. The number of gastrin-positive cells in patients with DM2, gastric pathology, and grade 2 infection was significantly greater than in case of grade 3 infection. Endocrine cells in gastric mucosa of DM2 patients were less abundant than in controls (23 and 56% respectively, $p < 0.05$). The density of gastric epitheliocytes significantly decreased in patients with the duration of DM2 above 10 years.

Conclusion. Metabolic disorders, local trophic disturbances, accelerated extrusion of erythrocytes, *H.pylori* colonization, and impaired regeneration in patients with DM2 cause atrophic changes in gastric mucosa, alter the number and ratio of G- and D-cells.

Key words: apudocytes, cytokines, gastritis, gastric ulcer, somatostatin

Скоплениями апудоцитов в слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) продуцируется более 30 цитокинов, влияющих на различные процессы жизнедеятельности организма. Гастрин образуется в G-клетках антральной части желудка и, кроме того, в небольшом количестве синтезируется в слизистой оболочке тонкой кишки [1]. Высвобождение гастрина из G-клеток подчинено механизму обратной связи: в ответ на действие различных факторов высвобождается гастрин, стимулирующий секрецию соляной кислоты (HCL), а ее избыток ингибирует дальнейший выброс гастрина. Гастрин относится к важным эндогенным гормонам, от которого зависят не только физиологические функции желудка, но и развитие патологического процесса в нем, в том числе и язвообразования. Повышение уровня гастрина в крови коррелирует с повышенной продукцией кислоты в желудке. У больных с язвенной болезнью желудка (ЯБЖ) в подавляющем большинстве случаев обнаруживается гипергастринемия [1–3].

Соматостатин выявляется в d-клетках ЖКТ и поджелудочной железы. В желудке эти клетки располагаются в собственном слое слизистой оболочки антрального отдела, преимущественно в непосредственной близости от клеток, продуцирующих гастрин, что подтверждает влияние соматостатина на секрецию этого гормона. Своеобразие распределения этих клеток, а именно их разбросанность среди других эндокринных клеток ЖКТ и поджелудочной железы представляет морфологическую основу для высвобождения и местного действия гормона на соседние клетки-мишени [2–4].

Существуют работы [2–7], в которых прослеживается связь между повышением уровня гастрина и снижением уровня соматостатина в крови со степенью инфицированности слизистой оболочки желудка (СОЖ) *H.pylori*. По мнению ряда авторов [5–8], *Helicobacter pylori* является стимулятором выработки гастрина в антральном отделе желудка.

Целью настоящего исследования явилось изучение содержания гастроинтестинальных гормонов в плазме крови,

Таблица 1

Количественная плотность нейроэндокринных клеток и концентрация регуляторных пептидов у пациентов всех клинических групп				
Показатели	ЯБЖ n=34		ХГ n=46	
	Среднее значение (вариабельность)		Среднее значение (вариабельность)	
	1А n=17	2А n=17	1Б n=25	2Б n=21
Гастрин (пг/мл)	19,96±1,1*	46,7±1,2	2,8±0,7	27,6±1,1**
Соматостатин (пг/мл)	8,4±0,4*	15,2±0,3	0,9±0,1	3,6±0,4**
G-G клетки (число в 10 полях зрения)	18,7±3,4*	32,5±2,9	10±2,7	21,2±3,2**
D-к D клетки (число в 10 полях зрения)	6,2±0,98*	10,3±1,2	7,4±2,8	12,4±3,2**

*p<0,05 достоверность различий между А группами

**p<0,05 достоверность различий между Б группами

морфофункционального состояния G- и D-клеток у пациентов с патологией желудка в сочетании с сахарным диабетом 2 типа (СД2).

Материал и методы исследования

Под нашим наблюдением находились 84 больных (муж. — 33, жен. — 51) с ЯБЖ и хроническим гастритом (ХГ) в возрасте от 49 до 70 лет (средний возраст 65 лет). У 46 пациентов указанные заболевания протекали на фоне СД 2. Пациенты с СД 2 были включены в две исследуемые группы — 21 пациент в 1А (ЯБЖ+СД) группу и 25 — в 1Б (ХГ+СД) группу. Средняя продолжительность СД составила 9,5±0,9 лет. Средний уровень гликированного гемоглобина (HbA_{1c}) — 11,2±0,6%. Группы сравнения были представлены больными без СД 2: 17 пациентов с ЯБЖ — 2А и группа из 21 больного с ХГ — 2Б группа. Во всех группах пациенты были сопоставимы по полу и возрасту. Из 21 больного ЯБЖ в сочетании с СД 2 из-за грубых нарушений целостности стенки лишь у 17 пациентов в перипульцеровозной зоне удалось верифицировать апудоциты.

Для полуколичественной оценки степени инфицированности H.pylori желудка применяли гистологический метод. Метод включал в себя производство парафиновых срезов с биоптатов СОЖ края язвы (перипульцеровозной зоны), антрального и фундального отделов желудка, с последующей их окраской по Гимзе по стандартному протоколу. В случае обнаружения инфекции H.pylori в гистологических препаратах, полуколичественную характеристику обсеменения данными бактериями СОЖ проводили следующим образом. При наличии не более 20 микробных тел в поле зрения микроскопа при увеличении 630, оценивали как слабую степень обсеменения (+), средняя степень обсеменения (++) имела место при количестве H.pylori до 50 в поле зрения, высокую степень контаминации (+++) определяли при количестве H.pylori более 50 в поле зрения.

Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование проводили в соответствии со стандартным протоколом. Был использован набор маркеров: хромогранин А, соматостатин и гастрин.

Подсчет окрашенных G и D клеток осуществляли при увеличении в 400 раз под микроскопом «Ампливал» (Герма-

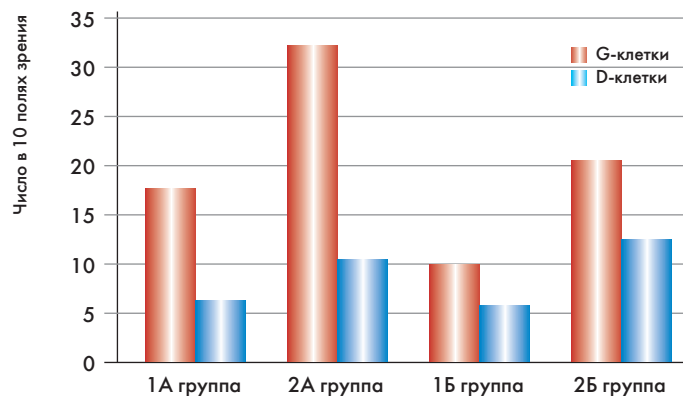


Рис. 1. Количественная плотность G- и D-клеток в исследуемых группах

ния). Их количество определяли в 10 полях зрения каждого из препаратов.

Определение гастрин-17 и соматостатина-14 производили иммуноферментным анализом. Контрольную группу составили 10 практически здоровых лиц, у которых исследовали средний нормальный уровень гастрин-17 и соматостатина-14.

Статистическую обработку данных проводили с использованием статистического пакета программы Statistica vers.6 с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Статистические данные приведены как среднее арифметическое $M \pm \delta$, где δ — среднее квадратичное отклонение.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 и в табл. 1 представлены результаты количественной плотности клеток G и D у пациентов с сочетанной патологией и их функциональное состояние.

Согласно полученным данным (см. табл. 1), концентрация регуляторных пептидов у больных с ЯБЖ и ХГ значительно колебалась. У пациентов с СД2 в сочетании с ЯБЖ и ХГ уровни гастрин-17 и соматостатина оказались низкими и при оценке результатов на основании статистического анализа

Таблица 2

Количественное соотношение эпителиоцитов у пациентов в зависимости от наличия H.pylori								
Показатели	СД 2				Контрольная группа			
	ЯБЖ n=17		ХГ n=25		ЯБЖ n=17		ХГ n=21	
	G-кл	D-кл	G-кл	D-кл	G-кл	D-кл	G-кл	D-кл
Hr+	21,3±1,2**	2,3±0,2**	15,6±1,1**	3,1±0,4**	33,3±1,1	4,2±0,4	25,6±0,6	7,8±1,1
Hr-	14,2±0,5*	6,1±0,3*	7,6±0,4*	6,5±0,4*	18,1±0,8*	11,3±0,4*	14,3±0,3*	13,3±0,3*

*p<0,05 между Hr+ и Hr- группами

**p>0,05 между исследуемой и контрольной группами

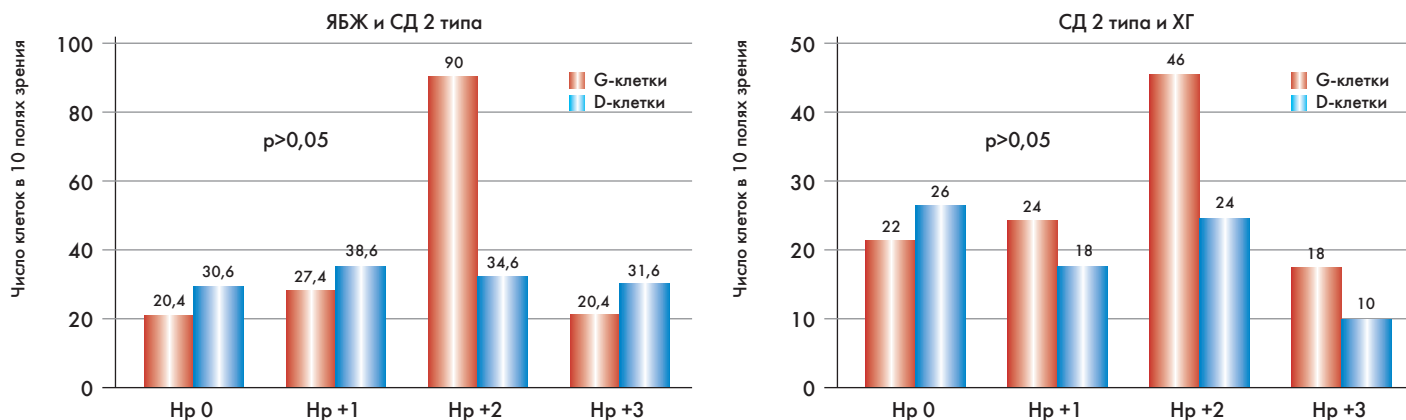


Рис. 2. Количественная плотность эпителиоцитов в зависимости от плотности *H. pylori*

были выявлены достоверные различия между уровнями гастроинтестинальных гормонов у больных СД2 и пациентами сравнимых групп ($p < 0,05$).

Согласно приведенным данным, количественная плотность эпителиоцитов СОЖ, иммунопозитивных к гастрину, была достоверно снижена у пациентов СД2. Аналогичная картина наблюдалась и у пациентов с ХГ в обеих группах.

Содержание эпителиоцитов, иммунопозитивных к соматостатину, также было достоверно ($p < 0,05$) снижено в группах пациентов СД2 (см. табл. 1 и рис. 1).

Таким образом, при сочетании ЯБЖ или ХГ с СД2 по сравнению с изолированной патологией желудка отмечено:

- уменьшение количественной плотности G-клеток
- уменьшение количественной плотности D-клеток
- снижение уровня гастрина
- снижение уровня соматостатина

Известно, что инфекции *H. pylori* придает ведущая роль в изменении желудочной секреции и основной мишенью для *H. pylori* среди эпителиоцитов СОЖ служат G-клетки.

В табл. 2 представлены данные по количественному соотношению эпителиоцитов у пациентов в зависимости от инфицированности *H. pylori*.

Таким образом, в биоптатах больных СД2, инфицированных *H. pylori*, по сравнению с биоптатами из аналогичных зон неинфицированных *H. pylori* пациентов имеется очевидное увеличение плотности G-клеток ($p < 0,05$) как в исследуемой, так и в контрольной группах. Количество

G-клеток у пациентов СД2 одинаково высоко в группах инфицированных в сравнении с неинфицированными пациентами СД2 и ЯБЖ.

Количество D-клеток в группе больных, инфицированных *H. pylori*, достоверно меньше по сравнению с группой больных, неинфицированных *H. pylori* ($p < 0,05$), у пациентов СД2 и ЯБЖ. Количество D-клеток у пациентов исследуемой и контрольной групп отличались недостоверно ($p > 0,05$). В группах пациентов с ХГ прослеживается аналогичная закономерность.

Нами проанализированы плотность иммунореактивных клеток по отношению к плотности *H. pylori*, результаты которого представлены на рис. 2.

В ходе анализа морфометрических показателей исследуемых эпителиоцитов СОЖ, иммунореактивных к гастрину и соматостатину, в зависимости от степени инфицированности *H. pylori* выявлено, что количество гастрин-иммунопозитивных клеток было достоверно больше при второй степени инфицированности *H. pylori* у пациентов СД2 с патологией желудка, однако, при третьей степени инфицированности *H. pylori* количество G-клеток снижалось. Вероятно, это было связано с высокой частотой гастрита с поражением желез и атрофией СОЖ при СД2.

Анализ количества хромогранина А в каждой обследуемой группе показал, что у наблюдаемых нами пациентов ЯБЖ и ХГ в сочетании с СД2 достоверно меньше, количество эндокринных клеток в СОЖ в сравнении с контрольной группой: 23% против 56% соответственно ($p < 0,05$).

Общеизвестно, что при СД в результате метаболических сдвигов формируются микроангиопатии, которые имеют генерализованный характер. Изменения сосудов обнаруживаются в различных органах и тканях, в том числе и в СОЖ. Мы предполагаем, что атрофические изменения СОЖ у пациентов сочетанной патологии являются следствием нарушения микроциркуляторного русла, снижающего при этом регенераторный потенциал СОЖ.

Из рис. 3 видно, что у пациентов с СД2 в отличие от контрольной группы достоверно чаще наблюдался гастрит с поражением желез и атрофией СОЖ (47,4% против 29,5% соответственно, $p < 0,05$ в 1-й группе, и 43% против 18,7% соответственно во 2-й группе $p < 0,05$), который наиболее часто ассоциировался со значительной степенью микробной колонизации. Вероятно, это является одной из причин изменения количественной плотности эпителиоцитов, иммунопозитивных к гастрину, и соматостатина.

Учитывая то, что наши пациенты с сочетанной патологией имели различную давность заболевания СД2, мы решили оценить ее влияние на количественную плотность эпителиоцитов желудка. На рис. 4 представлены результаты этого исследования.

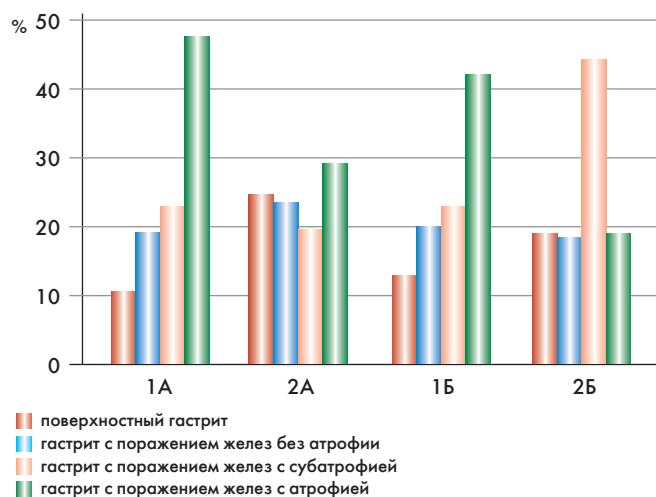


Рис. 3. Характеристика морфологических форм гастритов у исследуемых групп

Полученные данные свидетельствуют, что пациенты СД2, с длительностью заболевания более 10 лет имеют достоверно меньшее количество эндокринных клеток. Проведенный анализ морфологического состояния апудоцитов, показал, что процентное соотношение G/D-клеток в группах пациентов СД2 в сочетании с патологией желудка изменено по сравнению с группой контроля.

Известно, что эпителиальные клетки инфицированной СОЖ приобретают свойства макрофагов и экспрессируют DR-антигены главного комплекса гистосовместимости и секретируют цитокины. Цитокины, высвобождаемые СОЖ при Нр-ассоциированном гастрите вызывают нарушения функции эндокринных клеток [5]. С другой стороны, при поражениях СОЖ *H. pylori* снижается концентрация соматостатина. Таким образом, влияние этого «естественного ограничителя» секреции гастрина на G-клетки недостаточно. Установлено, что тормозит активность D-клеток ИЛ-8, секретируемый эпителиоцитами под действием *H. pylori* и клетками воспалительного инфильтрата слизистой оболочки желудка [4, 9].

Кроме того, при инфицировании штаммами *sagA(+)* отмечается повышение общего уровня пепсиногенов и уменьшение соотношения уровней пепсиногенов А/С, что повышает агрессивные свойства желудочного сока и возможно оказывает более глубокое влияние на количество и соотношение G- и D-клеток [6, 10].

Вероятнее всего, существует связь с активностью воспалительного процесса, где основную роль играют такие цитокины, как интерлейкин-1, фактор некроза опухолей (ФНО), которые выделяются клетками воспалительного инфильтрата собственной пластинки слизистой оболочки. Секреция гастрина резко возрастает при стимуляции ИЛ-1 и ФНО, для которых на мембране G-клеток имеются соответствующие рецепторы [11].

Возможным дополнительным фактором, влияющим на выработку гастрина и соматостатина, является опосредованное воздействие на G- и D-клетки локальной щелочной микро среды бактерий, обусловленной образованием аммиака. Роль соматостатина не ограничивается регуляцией продукции HCL. Показано, что он непосредственно подавляет пролиферацию *H. pylori*, то есть увеличивает резистентность организма к инфекции [6, 12].

Влияние *H. pylori* на желудочную секрецию не только прямое, но и опосредованное — вследствие развития ХГ, а его обратная эволюция требует значительного времени. При длительном течении СД 2 воспалительная инфильтрация нарастает, выявляются признаки склероза стромы и атрофические изменения. Сосудистые изменения в СОЖ, имеющие характер диабетических микроангиопатий, отмечены как в начальном периоде заболевания, так и при длительном течении болезни. Вследствие атрофических, дисрегенераторных изменений эпителиоцитов снижается синтез ферментов, сорбция на мембране эпителиоцитов дисахаридаз, пептидаз, щелочной фосфатазы. Это вызывает нарушение как полостного, так и мембранного пищеварения и сопровождается нарушением процессов гидролиза пищевых веществ, всасывания и внутриклеточного пищеварения.

H. pylori-ассоциированный гастрит при СД 2 сопровождается атрофией и кишечной метаплазией СОЖ. Более высокая частота атрофии и кишечной метаплазии СОЖ у больных СД 2 объясняется свойственными этому заболеванию вегетативными, метаболическими и микроциркуляторными расстройствами, способствующими нарушению клеточного обновления. Нарушению микроциркуляции способствуют *H. pylori*-колонизации. Продуктом, необходимым для защиты *H. pylori*, является мочевины, которая образуется при распаде эритроцитарного гемоглобина, а эритроцитарный гемоглобин, в свою очередь, появляется на

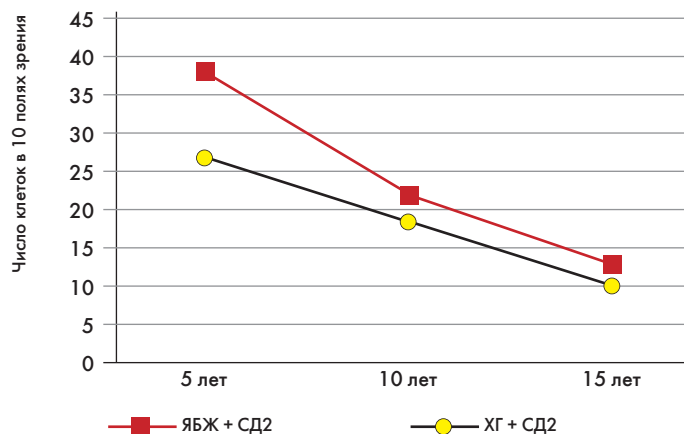


Рис. 4. Количественная плотность эпителиоцитов в зависимости от длительности СД2

поверхности эпителия при повреждении стенок кровеносных сосудов СОЖ.

Заключение

Таким образом, общую последовательность изменений в количественном составе апудоцитов СОЖ при СД2 можно представить в виде следующей схемы: метаболические нарушения, обусловленные наличием СД2 и его длительностью, осложнениями, локальные нарушения трофики, ускорение экстрюзии (отторжения) эпителиоцитов создают питательную среду (погибшие клетки) и возможность для колонизации *H. pylori*, которая, в свою очередь, размножаясь, повреждает мукоциты, и тем больше, чем интенсивнее степень колонизации. Происходит нарушение регенерации, «упрощение» дифференцировки клеток и сбой в ней (кишечная метаплазия), что завершается в конечном итоге, атрофией СОЖ различной степени и что приводит в конечном итоге к нарушению количества и соотношения друг к другу G- и D-клеток.

В последнее время отмечают, что больные СД2 относятся к группе риска по инфицированию *H. pylori*, в результате нарушения моторно-эвакуаторной, секреторной функции гастродуоденальной зоны, депрессии иммунитета, неудовлетворительной компенсации, длительности заболевания более 5 лет и характерных гистологических изменений СОЖ. Особое место в поражении желудка при СД занимает аутоиммунный гастрит, развивающийся у больных диабетом. Обнаружено, что у 15–20% пациентов, страдающих СД 2, в крови выявляются антипариетальные антитела. У лиц, не страдающих диабетом, эти антитела выявляются в 2–3 раза реже. Антипариетальные антитела направлены против антипортера H^+/K^+-ATP азы, и хроническое их воздействие на желудок может вести к развитию гипо- или ахлоргидрии, гипергастринемии, а также железо- и В12-дефицитной анемии. Действительно, у больных СД 2 с положительным титром антипариетальных антител выявляется пониженный уровень базальной секреции кислоты, коррелирующий с содержанием железа (уменьшение кислотности ведет к нарушению всасывания ионов железа). Также у этой группы больных отмечается повышение концентрации в крови гастрина, уровень которого коррелирует с титром антипариетальных антител. Титр антител коррелирует с выраженностью и распространенностью процессов атрофии слизистой желудка. Для более подробного изучения и выявления изменений необходимо дифференцировать ультраструктуру клеток у инфицированных и неинфицированных пациентов, исследовать уровни провоспалительных цитокинов.

Литература

1. Егорова Е.Ю. Диагностика и лечение эрозий и язв желудка у больных хроническими неспецифическими заболеваниями легких. Дис... канд. мед. наук. – М. – 1991 г.
2. Kaneko H, Nakada K, Mitsuma T, et al. Helicobacter pylori infection induces a decrease in immunoreactive-somatostatin concentration of human stomach. Dig Dis Sci 1992;37:409–16.
3. Макина О.В. Патология гастродуоденальной зоны и состояние окислительного стресса при сахарном диабете 1 типа. Дис.... канд. мед. наук. – М. – 2006 г.
4. Hersey SJ, Sachs GSJ. Gastric acid secretion. Physiol Rev 1995;75:155–89.
5. Lloyd KC, Wang J, Aurang K, et al. Activation of somatostatin receptor subtype 2 inhibits acid secretion in rats. Am J Physiol 1995;268:G102–6.
6. Levi S, Beardshall K, Haddad G, et al. Campylobacter pylori and duodenal ulcers: the gastrin link. Lancet 1989;i:1167–8.
7. Y Liu1, G D C Vosmaer2, G N J Tytgat3, S-d Xiao4 and F J W Ten Kate1 Gastrin (G) cells and somatostatin (D) cells in patients with dyspeptic symptoms: Helicobacter pylori associated and non-associated gastritis 1996:116–123.
8. Queiroz DMM, Mendes EN, Rocha GA, et al. Effect of Helicobacter pylori eradication on antral gastrin- and somatostatin-immunoreactive cell density and gastrin and somatostatin concentrations. Scand J Gastroenterol 1993;28:858–64.
9. Wu SV, Giraud A, Mogard M, et al. Effects of inhibition of gastric secretion on antral gastrin and somatostatin gene expression in rats. Am J Physiol 1990;258:G788.
10. Schubert ML, Edwards NF, Makhlof GM. Regulation of gastric somatostatin secretion in the mouse by luminal acidity: a local feedback mechanism. Gastroenterology 1988;94:317–22.
11. Mihaljevic S, Katicic M, Karner I, et al. The influence of Helicobacter pylori infection on gastrin and somatostatin values present in serum. Hepatogastroenterology 2000;47:1482–4.
12. Martinze V, Curi AP, Torkian Bschaefter JM, et al. High basal gastric acid secretion in somatostatin receptor subtype 2 knockout mice. Gastroenterology 1998;114:1125.

Мкртумян А.М.	д.м.н., профессор, заведующий кафедрой эндокринологии и диабетологии ГОУ ВПО Московский Государственный медико-стоматологический университет, Москва
Маев И.В.	д.м.н., профессор, заведующий кафедрой пропедевтики внутренних болезней ГОУ ВПО Московский Государственный медико-стоматологический университет, Москва
Баирова К.И.	аспирант кафедры эндокринологии и диабетологии ГОУ ВПО Московский Государственный медико-стоматологический университет, Москва E-mail: bairova@list.ru
