

---

# Imunohistochemická studie mechanismů apoptózy a proliferace ve sliznici tenkého střeva u celiakální sprue

---

Lísová S.<sup>1</sup>, Ehrmann J.<sup>1</sup>, Kolek A.<sup>2</sup>, Sedláková E.<sup>1</sup>, Kolář Z.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav patologie LF UP a FN, Olomouc

<sup>2</sup>Dětská klinika FN, Olomouc

---

## Souhrn

Mechanismy vedoucí k morfologickým změnám sliznice tenkého střeva při glutenové enteropatii nebyly dosud plně objasněny, ačkoliv se v současné době uvažuje o dvou hlavních mechanismech: remodelaci sliznice matrixovými metaloproteinázami a atrofii sliznice způsobené zvýšenou apoptózou. Cílem naší studie bylo analyzovat expresi proteinů regulujících apoptózu a některých proliferčních markerů ve sliznici tenkého střeva u dětí s aktivní (AC) a latentní formou (LC) celiakální sprue (CS). Pomocí nepřímé imunohistochemie byla u střevních biopsií 43 dětí s aktivní a latentní formou CS detekována a analyzována exprese Fas, Fas ligandy (Fas-L), tkáňové transglutaminázy (tTG), Bcl-2, Bid, glutathion S-transferázy (GST), CAS 3, CAS 8, PARP, Ki-67, Topoisomerázy IIa a PCNA. Nalezli jsme signifikantně nižší hodnoty exprese Fas na enterocytech u pacientů s AC než u pacientů s LC a kontrol. Počet Fas-positivních slizničních lymfocytů byl snížen u AC v porovnání s LC. Exprese Fas-L v enterocytech a slizničních lymfocytech byla vyšší u AC a LC v porovnání s kontrolami. Nalezli jsme signifikantně více Bcl-2 negativních lymfocytů u AC než u LC a kontrol. Exprese Bid v enterocytech byla vyšší u LC v porovnání s AC a kontrolami. V intraepiteliálních lymfocytech (IEL) byla též vyšší exprese Bid u LC než u AC a kontrol a na rozdíl od lymfocytů lamina propria, kde největší počet buněk exprimujících Bid byl nalezen u kontrol. Exprese CAS 8 byla signifikantně vyšší v kryptálních lymfocytech u AC ve srovnání s LC. Exprese tTG v extracelulární matrix a bazální membráně byla signifikantně vyšší u LC a AC ve srovnání s kontrolami. Exprese tTG byla vyšší ve skupině AC i LC než u kontrol, jak v enterocytech tak i ve slizničních lymfocytech. Naše nálezy ukazují možnost spoluúčasti Fas/Fas-L, Bcl-2 a CAS 8 na regulaci apoptózy u CS. Zvýšená apoptotická eliminace IEL u LC může částečně vysvětlit zachování normální vilózní morfologie střevní sliznice. Zvýšená exprese tTG může být časným znakem zvýšené apoptózy a může být v souladu s její rolí v patogenezi CS.

**Klíčová slova:** celiakie – apoptóza – Fas/Fas-L – CAS 3,8 – PARP

## Summary

### Immunohistochemical Study of the Apoptotic and Proliferative Mechanisms in the Intestinal Mucosa During Coeliac Disease

Mechanisms leading to morphological changes of the small intestine during coeliac disease are not yet completely recognized, however, two main processes have been suggested recently: remodelling of mucosa by matrix metalloproteinases, and mucosal atrophy by apoptosis. The aim of this study was to analyze the expression of proteins regulating apoptosis and some markers of proliferation in the mucosa of the small intestine of children with active (ACD) and latent form (LCD) of coeliac disease (CD). Intestinal biopsies of 43 children with ACD and LCD were analyzed by standard indirect immunohistochemical technique for Fas, Fas ligand (Fas-L), tissue transglutaminase (tTG), Bcl-2, Bid, glutathione S-transferase (GST), CAS 3, CAS 8, PARP, Ki-67, Topoisomerase IIa, PCNA expression. We found significantly lower numbers of Fas-expressing enterocytes in ACD patients than in LCD patients and controls. The number of Fas-positive mucosal lymphocytes was decreased in ACD when compared with LCD. Fas-L expression in enterocytes and mucosal lymphocytes was higher in ACD and LCD compared to controls. We found significantly more Bcl-2 negative lymphocytes in ACD than in LCD and controls. Bid expression in enterocytes was higher in LCD compared to ACD and controls. In intraepithelial lymphocytes, there was higher Bid expression in LCD than in ACD and controls compared to expression in mucosal lymphocytes, where was found higher number of positive cells in controls than in ACD and LCD. Expression of CAS 8 in mucosal lymphocytes was significantly higher in ACD compared to LCD. The expression of tTG in extracellular matrix and basal lamina was significantly higher in LCD and ACD when compared to controls. Expression of tTG was higher in the group of ACD and LCD in the enterocytes and in the lymphocytes. Our findings showed that Fas/Fas-L, Bcl-2, and CAS 8 may be involved in modulation of apoptosis during CD. Increased apoptotic elimination of IEL in LCD can partially explain preservation of the normal villous architecture. Increased tTG

expression may be an early sign of increased apoptosis or may be related to its role in CD pathogenesis.

**Key words:** coeliac disease – apoptosis- Fas/Fas-L – Cas 3,8 – PARP

*Čes.-slov. Patol., 41, 2005, No. 3, p 85–93*

Celiakální sprue (CS) je definována jako celoživotní intolerance lepku (glutenu), přesněji jeho frakce a-gliadinu, u geneticky predisponovaných jedinců, s charakteristickými morfologickými změnami sliznice tenkého střeva. Reálná incidence tohoto onemocnění, zjišťovaná sérologickým skríníngem, je udávána v evropské populaci mezi 1:300 až 1:85 (22). Poškození střevní sliznice vyvolává obvykle malabsorpci s jejími klinickými a biochemickými projevy. Odstranění lepku ze stravy vede k remisi onemocnění a je v současnosti jediným druhem terapie. Mimo typického malabsorpčního syndromu jsou v literatuře uváděny i další závažné komplikace neléčené celiakie, včetně zvýšeného výskytu T lymfomu tenkého střeva, karcinomu jícnu či karcinomu faryngu (11, 12). Diagnostika celiakální sprue je založena na pozitivitě sérologického vyšetření hladiny protilátek proti endomyziu (EMA), popřípadě protilátek proti gliadinu (AGA) nebo retikulínu (ARA) a na histologickém vyhodnocení jejunální sliznice. Morfologické změny jejunální sliznice u celiakie zahrnují zánětlivou infiltraci, remodelaci a atrofii. Mechanismy vedoucí k morfologickým změnám nejsou zatím kompletně prostudovány. Zdá se však, že těchto mechanismů je několik. Lepek je po zpracování ve střevní sliznici předkládán antigen prezentujícími buňkami T lymfocytům, které uvolňují zánětlivé mediátory. Ty stimulují mimo jiné tvorbu metaloproteináz, které se významnou měrou podílejí na remodelaci střevní sliznice (47). Je též diskutována role zvýšené permeability střevního epitelu a role defektního zpracování lepku enterocyty (31, 32, 45, 56, 57). Účast na rozvoji slizničních změn mají také mechanismy programované buněčné smrti – apoptózy. U neléčené celiakie již byla prokázána vystupňovaná apoptóza enterocytů, zprostředkovaná cytotoxickými T lymfocyty v lamina propria i intraepiteliálními lymfocyty dráhou perforinu/granzymu B (7, 24, 40, 51). Efekt perforinu může být modulován některými členy rodiny Bcl-2, které regulují apoptózu změnou permeability mitochondriální membrány i dalšími proteiny, jako například glutathion S-transferázou (GST), (17, 18). Dalším z klíčových proteinů uplatňujících se v patogenezi CS (39, 41, 42, 53) a zároveň jedním z časných indikátorů apoptózy je tkáňová transglutamináza (tTG) (1, 2, 49). Tkáňová transglutamináza se podílí na deamidaci gliadinových peptidů, s nimiž tvoří komplexy, které při rozvoji zánětlivé odpovědi zprostředkované specifickými T lymfocyty

fungují jako autoantigeny. Tyto komplexy byly též prokázány v extracelulární matrix a bazální membráně střevního epitelu (31, 32, 45, 53, 56, 57). Apoptóza enterocytů zprostředkovaná cytotoxickými T lymfocyty je aktivovaná z významné části interakcí Fas a Fas ligandy (Fas-L). Dosud nebyla provedena komplexnější studie zabývající se analýzou exprese těchto znaků účastnících se apoptózy. Provedli jsme proto analýzu exprese proteinů Fas, Fas-L, tkáňové transglutaminázy (tTG), glutathion S-transferázy (GST), perforinu, kaspázy 3 a 8 (CAS-3, CAS-8), PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase) a proteinů Bcl-2, Bid, proliferčních markerů Ki-67, topoizomerázy IIa a PCNA v jejunální sliznici nemocných s rozvinutou, latentní a potenciální formou celiakie a u kontrolní skupiny, s cílem přispět k detailnějšímu poznání mechanismů podílejících se na remodelaci sliznice tenkého střeva u nemocných s celiakální sprue. Vzorky jsme dále vyšetřili i metodou TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick End Labeling) na přítomnost fragmentované DNA v buňkách.

---

## Materiál a metody

---

V našem souboru bylo celkem 64 střevních biopsií od pacientů vyšetřovaných na Dětské klinice LF UP a Fakultní nemocnice v Olomouci, v období 1997–2000. Celiakální sprue byla diagnostikována ve shodě s revidovanými kritérii ESPGAN (European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition) (59). Aktivní, potenciální a latentní forma celiakie byly klasifikovány na základě návrhu Fergusona a spol (14). V naší studii jsme měli celkem 25 dětí s aktivní neléčenou formou celiakie (AC), v průměrném věku 7,5 let; u všech byly pozorovány klinické projevy malabsorpčního syndromu (průjmy, opoždění růstu, váhový úbytek, atd.). Histologické vyšetření prokázalo subtotální nebo totální atrofii střevní sliznice Marsh 3b nebo 3c, dle modifikované Marshovy histopatologické klasifikace (26) a u všech byla prokázána pozitivita antiendomyziálních protilátek (EMA). Ve skupině s latentní formou celiakie (LC) bylo 18 dětí, v průměrném věku 10,9 let, u kterých byla potvrzena expozice lepkiem alespoň po dobu 3 měsíců. U všech byla prokázána pozitivita EMA; u 7 pacientů byla zjištěna normální morfologie jejunální sliznice (Marsh 0), u 11 bylo zjištěno více