

УДК [611.33:612.014.2]:616.33-002.44

Т. А. Агеева¹, Ю. Г. Мальцева¹, Л. Н. Чернова²

¹ Новосибирский государственный медицинский университет
Красный пр., 52, Новосибирск, 630091, Россия

² Медико-санитарная часть ГУВД по Новосибирской области
ул. Коммунистическая, 75, Новосибирск, 630099, Россия

E-mail: malyg@ngs.ru

ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЦЕССОВ КЛЕТОЧНОГО ОБНОВЛЕНИЯ В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ЖЕЛУДКА ПРИ ЯЗВЕННОЙ БОЛЕЗНИ

При обострении язвенной болезни желудка высокий уровень пролиферации (индекс метки Ki-67) и апоптоза (индекс метки p53) эпителиоцитов сочетается с хаотичным, но повышенным уровнем индекса метки антиапоптотического гена bcl-2 в широкой от очага повреждения зоне слизистой оболочки. Данные маркеры отражают нарушения процессов репаративной регенерации слизистой оболочки желудка в периаульцерозной зоне радиусом 8 см.

Ключевые слова: язвенная болезнь желудка, апоптоз, пролиферация.

Слизистую оболочку желудка (СОЖ) относят к быстропролиферирующим тканям вследствие постоянного интенсивного эпителиального обновления, включающего фазу пролиферации, дифференцировки и гибели клеток. Регуляция постоянства структуры слизистой оболочки осуществляется путем поддержания равновесия между процессами образования и гибели клеток. При уравнивании этих двух процессов сохраняется структурно-функциональное постоянство, преобладание процессов гибели клеток приводит к атрофии, а пролиферации – к гиперплазии слизистой оболочки [1].

Язвенная болезнь желудка – хроническое рецидивирующее заболевание, сопровождающееся чередованием процессов деструкции и репарации СОЖ. Формирование язвенного дефекта (ЯД) обусловлено гибелью эпителиоцитов в СОЖ вследствие деструктивных процессов и апоптоза. Соответственно на этапе рубцевания язвы в эпителии СОЖ отмечаются процессы гиперрегенерации. Известно, что хроническое воспаление вокруг ЯД распространяется за

его пределы на некоторое расстояние [2], что изменяет процессы клеточного обновления в СОЖ в значительной зоне от очага деструкции, при этом границы и масштабы этих нарушений не в полной мере изучены. Необходимо учитывать, что нарушенный пролиферативный статус является фоновым состоянием для формирования злокачественных новообразований [3], в связи с чем представляется важной оценка процессов репаративной регенерации как в зоне, прилегающей к язвенному дефекту, так и на удалении от него.

Цель исследования – оценить состояние процессов апоптоза и пролиферации в слизистой оболочке периаульцерозной зоны желудка при язвенной болезни желудка.

Материал и методы

Объектом исследования послужили гистобиоптаты из периаульцерозной зоны СОЖ. Критериями включения были следующие: возраст больного более 18 лет, наличие язвенной болезни желудка с клиническими признаками обострения, при этом язвенный

дефект располагался в пилоро-антральном отделе органа. Критерии исключения: клинико-морфологические признаки пенетрации язвы в подлежащие органы, наличие признаков грубой дисплазии эпителия, морфологически подтвержденной карциномы СОЖ, острые и симптоматические язвы желудка, неинформативный биопсийный материал.

Обследованы 43 человека с язвенной болезнью желудка в стадии обострения в возрасте от 26 до 78 лет, из них 31 мужчина (72,1 %) и 12 женщин (27,9 %). Среди мужчин преобладали пациенты в возрастной группе 40–59 лет (20 из 31), у женщин язвенная болезнь желудка наиболее часто диагностировалась в старшей возрастной группе: 8 из 12 пациенток были старше 60 лет. Средний возраст больных составил $52,0 \pm 2,4$ лет. Все обследованные подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Диагностическая фиброэзофагогастродуоденоскопия проводилась по клиническим показаниям с забором биопсийного материала СОЖ. Язвенный дефект располагался в пилоро-антральном отделе желудка, диаметр язвенного дефекта колебался от 0,4 до 4,0 см. Преобладали в 72,1 % случаев хронические язвы с диаметром дефекта от 0,5 до 1,0 см. Биопсия производилась из края язвенного дефекта и на расстоянии 1, 3, 5 и 8 см от него в пределах антрально-пилорического отдела желудка. Полученные фрагменты СОЖ фиксировали в 10 % нейтральном забуференном формалине (рН 7,2–7,4) в течение 12–24 ч, заливали в парафин по общепринятой методике. Парафиновые срезы толщиной 3–5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике, пикрофуксином по ван Гизону [4]. Состояние СОЖ оценивали согласно визуально-аналоговой шкале полук количественной оценки морфологических изменений по М. F. Dixon [5]. Для визуализации *H. pylori* применяли окраску по Гимзе.

Пролиферативную активность эпителиоцитов оценивали по экспрессии ими белков Ki-67, апоптоз – bcl-2 и p53. Иммуноморфологическое окрашивание гастробиоптатов проводили согласно методическим рекомендациям фирмы-производителя («Dako», Дания). Перед реакцией иммунного окрашивания производили демаскировку анти-

генов тканей посредством нагревания на водяной бане в 10 мМ цитратном буфере (рН 9,0), блокировали эндогенную пероксидазу 3 % раствором H_2O_2 . Затем инкубировали срезы с первичными антителами к белкам Ki-67, bcl-2, p53 («Dako», Дания) по стандартной методике. Для иммунного окрашивания использовали пероксидазный метод («Dako En Vision Flex, HRP», Дания), ядра клеток докрашивали гематоксилином. Ставились позитивные и негативные контрольные реакции.

В гастробиоптатах при 400-кратном увеличении микроскопа рассчитывали индекс метки (ИМ) показателей Ki-67, p53 и bcl-2 как процентное отношение числа иммуногистохимически позитивных ядер эпителиоцитов СОЖ в 10 случайно выбранных полях зрения на 1 000 клеток.

Обработка полученного материала производилась методами вариационной статистики. Оценка достоверности отличий показателей (p) проводилась методом χ^2 и по t -критерию Стьюдента, отличия между сравниваемыми величинами признавались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение

Морфологическая картина гастробиоптатов периульцерозной зоны в период обострения язвенной болезни желудка характеризуется неоднородностью в пределах исследуемой восьмисантиметровой зоны. В биоптатах СОЖ из краев язвенного дефекта в 34,9 % случаев присутствовали фрагменты некротического детрита, в 2,3 % случаев – фибриноидный некроз слизистой оболочки, наличие которых характерно для очага повреждения. Во всех образцах определялась лимфоплазмоцитарная инфильтрация в собственной пластинке, распространяющаяся на мышечную пластинку СОЖ. В преобладающем большинстве случаев клетки инфильтрата располагались тесно друг к другу, что соответствует выраженной степени хронического воспаления. В составе подвижного инфильтрата стромального компартмента слизистой оболочки присутствовали сегментоядерные лейкоциты, что указывало на активность воспалительного процесса. Активность воспаления сохранялась на всем протяжении периульцерозной зоны, но имела четкую тенденцию к ее

уменьшению по мере удаления от ЯД (табл. 1).

В исследуемых участках периульцерозной зоны *H. pylori* выявлен у всех пациентов хотя бы в одной из исследуемых точек, но частота выявления в изученных зонах была различной. В крае ЯД выявляемость *H. pylori* была минимальной (20,9 %), в радиусе до 5 см она соответствовала общепопуляционным значениям (74,4, 76,7 и 79,1 % соответственно 1, 3 и 5 см от ЯД), достигая своего максимума на пятисантиметровом удалении от ЯД (см. табл. 1). На расстоянии 8 см от очага повреждения обсемененность *H. pylori* вновь снижалась и не достигала уровня общепопуляционных показателей. При этом в крае ЯД преобладали минимальная и умеренная степени обсемененности (суммарно они составили 16,2 %), а по удалении степень обсемененности хеликобактером увеличивалась.

Диспластические изменения СОЖ выявлялись в радиусе 5 см от ЯД и характеризовались преимущественно минимальными изменениями эпителия в виде увеличения диаметра и гиперхромии ядер, увеличения ядерно-цитоплазматических отношений. Умеренная дисплазия с более выраженными клеточными изменениями и многорядностью в эпителиальной выстилке отмечена в крае и на расстоянии 1 см от очага деструкции (см. табл. 1).

Известно, что фоном для развития злокачественных новообразований служат атрофические изменения слизистой оболочки, являющиеся следствием выраженных нарушений клеточного обновления. С современных позиций атрофические изменения в СОЖ могут быть обусловлены количественным дефицитом желез с замещением их

соединительнотканной стромой (абсолютная атрофия) либо замещением клеток специализированных желез эпителием другого типа вследствие метаплазии (кишечной или пилорической) – метапластическая (качественная) атрофия [6–8]. В исследованных гастробиоптатах на протяжении всей восьмисантиметровой периульцерозной зоны атрофические изменения в различных сочетаниях качественных и количественных изменений выявлялись с разной частотой, но отмечены в преобладающем большинстве образцов из краев ЯД и на расстоянии 1 см (см. табл. 1).

Атрофия собственных желез была преимущественно абсолютной, обусловленной убылью желез и склеротическими изменениями в слизистой оболочке. Доля метапластической атрофии невелика; наиболее часто она определялась в крае язвенного дефекта и на расстоянии 1 см от него в одинаковом количестве биоптатов (по 13,9 %), в наименьшем числе случаев – на расстоянии 5 см (4,7 %).

Гиперпластические процессы в виде фовеолярной и полиповидной гиперплазии характеризовались более четкой динамикой к уменьшению по мере удаления от зоны повреждения. Степень выраженности гиперпластических изменений была наибольшей в радиусе 3 см от ЯД.

Пролиферативная активность эпителия желудка оценивалась по экспрессии белка Ki-67. Известно, что в СОЖ без патологических изменений зоной пролиферации является шеечный отдел желез и перешеек [9]. В исследуемой околоязвенной зоне значительное количество Ki-67-позитивных клеток обнаруживалось выше и ниже этой области, и плотность распределения их была

Таблица 1

Морфологическая характеристика собственной пластинки слизистой оболочки желудка у обследованных больных

Морфологический признак	Край ЯД (n = 43)	Участок на расстоянии от ЯД			
		1 см (n = 43)	3 см (n = 43)	5 см (n = 43)	8 см (n = 43)
	1	2	3	4	5
Гастрит атрофический	27	26 $p_3 \leq 0,05$	16 $p_1 \leq 0,05$	23	21
диффузный	16	17 $p_3 \leq 0,05$	27 $p_1 \leq 0,05$	20	22

Окончание табл. 1

Воспаление	43	43	43	43	43
минимальное	2	–	–	2	–
умеренное	7	9	11	6	5
выраженное	34	34	32	34	38
Активность	43	43	43	43	41
минимальная	5	10 $p_4 \leq 0,05$ $p_5 \leq 0,05$	13 $p_1 \leq 0,05$ $p_5 \leq 0,05$	16 $p_1 \leq 0,05$	18 $p_1 \leq 0,05$
умеренная	17	22 $p_4 \leq 0,05$ $p_5 \leq 0,05$	23 $p_1 \leq 0,05$ $p_5 \leq 0,05$	25 $p_1 \leq 0,05$	23 $p_1 \leq 0,05$
выраженная	21	11 $p_4 \leq 0,05$ $p_5 \leq 0,05$	7 $p_1 \leq 0,05$ $p_5 \leq 0,05$	2 $p_1 \leq 0,05$	– $p_1 \leq 0,05$
Нет активности	–	–	–	–	2
Атрофия	27	26	16	23	21
минимальная	3	4	2	5	5
умеренная	5	6	5	6	3
выраженная	19	16	9	12	13
Степень склероза	33	34	22 $p_1 \leq 0,05$	28 $p_1 \leq 0,05$	21
минимальная	6	12	13 $p_1 \leq 0,05$	12 $p_1 \leq 0,05$	8
умеренная	9	12	7 $p_1 \leq 0,05$	14 $p_1 \leq 0,05$	3
выраженная	18	10	5 $p_1 \leq 0,05$	2 $p_1 \leq 0,05$	10
Колонизация <i>H. pylori</i>	18	32 $p_1 \leq 0,05$	33 $p_1 \leq 0,05$	34 $p_1 \leq 0,05$ $p_5 \leq 0,05$	23 $p_1 \leq 0,05$
минимальная	3 $p_4 \leq 0,05$	6 $p_1 \leq 0,05$	6 $p_3 \leq 0,05$	7 $p_5 \leq 0,05$	5 $p_1 \leq 0,05$
умеренная	8	16 $p_1 \leq 0,05$	12 $p_1 \leq 0,05$	19 $p_1 \leq 0,05$ $p_5 \leq 0,05$	8 $p_1 \leq 0,05$
выраженная	7 $p_4 \leq 0,05$	10 $p_1 \leq 0,05$	15 $p_1 \leq 0,05$	8 $p_5 \leq 0,05$	10 $p_1 \leq 0,05$
отсутствует	25	11 $p_1 \leq 0,05$	10 $p_1 \leq 0,05$	9 $p_1 \leq 0,05$ $p_5 \leq 0,05$	20 $p_1 \leq 0,05$
Гиперплазия	15	20	20	16	13
сочетание фовеолярной и полиповидной гиперплазии	8	8	11	4	3
Дисплазия	12	11	7	6	–
минимальная	11	10	7	6	–
умеренная	1	1	–	–	–
выраженная	–	–	–	–	–
Метаплазия	6	6	4	2	3
кишечная	6	5	4	2	3
пилорическая	0	1	0	0	0

различной. В крае ЯД и на расстоянии 1 см от зоны деструкции ядерный ИМ Ki-67 в виде тесно расположенных клеток с окрашенными ядрами определялся в области шеек и перешейки желез, скопления и отдельные Ki-67-позитивные эпителиоциты обнаруживались в покровно-ямочном эпителии на поверхности желудочных валиков, единичные меченые клетки встречались в доньях желез.

На расстоянии 3 и 5 см от ЯД наибольшая плотность Ki-67-экспрессирующих клеток наблюдалась в области шеек и перешейка желез, отдельные меченые клетки и небольшие скопления их находили в покровно-ямочном эпителии, отдельные меченые эпителиоциты обнаруживали в верхней трети желез.

На удалении 8 см от очага деструкции Ki-67-позитивные клетки определялись группами и скоплениями в шеечном отделе и перешейке желез, единичные рассеянные эпителиоциты встретились в покровно-ямочном эпителии и в донных отделах желез.

Таким образом, зона пролиферации несколько мигрировала на определенном расстоянии от ЯД: ближе к очагу повреждения (в крае и на расстоянии 1 см) она распространялась вверх от нормального местоположения, обеспечивая репарацию эпителия, а начиная с 3 см уходила вниз к области доньев желез, обеспечивая репарацию и регенерацию железистого эпителия и поддерживая целостность структуры СОЖ.

В крае язвенного дефекта ИМ Ki-67 обнаруживал пониженные значения (табл. 2)

относительно показателя пролиферации при *H. pylori*-позитивном поверхностном и атрофическом гастритах без эрозивно-язвенных дефектов ($27,5 \pm 3,4$ и $26,4 \pm 5,1$ соответственно) [10]. Причиной снижения этого показателя в условиях наличия хеликобактера во всех указанных типах гастрита, вероятно, является очаг повреждения и сопутствующие процессы выраженного склерозирования и атрофии СОЖ.

В радиусе от ЯД в 1 и 3 см периульцерозной зоны ИМ Ki-67 соответствовал уровню пролиферации при *H. pylori*-позитивном поверхностном и атрофическом гастритах без эрозивно-язвенных дефектов ($27,5 \pm 3,4$ и $26,4 \pm 5,1$ соответственно), полученных в исследовании А. В. Кононова и соавт. [10]. Снижение показателя пролиферации эпителиоцитов СОЖ на 5 и 8 см от очага повреждения отражает понижение уровня гиперрегенераторных реакций. Это может быть обусловлено как большей удаленностью от язвенного дефекта, так и снижением степени обсемененности *H. pylori* в биоптатах из этих зон, где преобладали умеренная и низкая степени в совокупности (см. табл. 1).

Хотя уровень экспрессии Ki-67 характеризовался снижением на различных расстояниях от ЯД, индекс пролиферации во всех изученных точках периульцерозной зоны превышал значение аналогичного показателя при *H. pylori*-негативном хроническом поверхностном гастрите без язвенного дефекта ($15,4 \pm 4,2$) [10].

Активность апоптоза определяли по уровню ядерного белка p53 и антиапоптоти-

Таблица 2

Показатели пролиферации и апоптоза
в эпителиоцитах слизистой оболочки желудка
у обследованных пациентов

Индекс метки	Край ЯД (n = 43)	Участок на расстоянии от ЯД			
		1 см (n = 43)	3 см (n = 43)	5 см (n = 43)	8 см (n = 43)
		2	3	4	5
Ki-67	$20,7 \pm 3,9$	$27,4 \pm 2,1$ $p_4 \leq 0,05$ $p_5 \leq 0,05$	$26,4 \pm 2,8$ $p_4 \leq 0,05$ $p_5 \leq 0,05$	$20,2 \pm 1,4$	$18,6 \pm 1,2$
p53	$0,76 \pm 0,52$	$0,52 \pm 0,09$	$0,29 \pm 0,39$	$0,38 \pm 0,23$	$0,32 \pm 0,18$
bcl 2	$0,029 \pm 0,014$	$0,015 \pm 0,008$ $p_3 \leq 0,05$	$0,054 \pm 0,013$	$0,040 \pm 0,013$	$0,062 \pm 0,016$

ческого гена *bcl-2* в эпителиоцитах слизистой оболочки желудка. В норме экспрессия белка *p53* выявляется в единичных эпителиоцитах СОЖ. Это можно объяснить тем, что реализация программы запрограммированной гибели клетки в СОЖ происходит без генетически детерминированного *p53*-зависимого пути запуска [11] либо диагностическая концентрация данного белка значительно ниже порога чувствительности метода.

Индукция апоптоза происходит при наличии повреждений в ДНК клеток. В радиусе 8 см от язвенного дефекта экспрессия *p53* выявлялась в немногочисленных эпителиальных клетках слизистой оболочки желудка с локализацией в поверхностном эпителии или же в донных отделах желез. Показатели в распределении ИМ *p53* характеризовались снижением по мере удаления от очага деструкции: максимальное значение ИМ *p53* определялось в крае ЯД, минимальное – на расстоянии 3 см, сохраняясь на невысоком уровне с незначительными колебаниями до расстояния 8 см от ЯД (см. табл. 2).

В норме *bcl-2* в СОЖ не выявляется, но его экспрессия определяется у 70 % пациентов с атрофическим гастритом и кишечной метаплазией [12]. В нашем исследовании экспрессия *bcl-2* имела место преимущественно в зоне шеек желез, была невысокой на всем протяжении восьмисантиметровой зоны и носила мозаичный характер распределения, при этом в распределении *bcl-2*-позитивных эпителиоцитов прослеживалась некоторая динамика к увеличению показателя ИМ по мере удаления от ЯД: минимальный ИМ отмечен на расстоянии 1 см, максимальный – на 8 см от зоны некроза (см. табл. 2).

Заключение

Пролиферативная активность мукоцитов СОЖ на всем протяжении восьмисантиметровой периаульцерозной зоны характеризовалась расширением границ пролиферативного компартмента, вовлекая покровно-ямочный эпителий и эпителий доньев желез, не ограничиваясь областью шейки и перешейка желез. Пролиферативная активность эпителиа СОЖ имела наибольшие показатели в радиусе 3 см от ЯД, уменьшаясь по мере удаления от него, что морфологически

выражалось в появлении гиперпластических образований.

Высокие показатели индуктора апоптоза *p53* при низком уровне антиапоптотического гена *bcl-2* обуславливали высокую апоптотическую активность в периаульцерозной зоне СОЖ. В совокупности с высоким уровнем пролиферации это приводило к выраженным нарушениям естественных процессов клеточного обновления в широкой к язвенному дефекту зоне, проявляющегося хаотичным сочетанием процессов количественной и качественной атрофии, гиперплазии, наличием изменений в дифференцировке эпителиоцитов в виде дисплазии и метаплазии, и может служить фоном для формирования злокачественных новообразований.

Список литературы

1. Шимчук С. Ф. Изучение показателей пролиферации и апоптоза клеток желудочного эпителиа у больных с предраковой патологией желудка // Эксперимент. и клинич. гастроэнтерология. 2005. № 4. С. 68–72.
2. Бобровских А. М., Бобровских М. П. Гистотопография распределения свободных клеток стромы слизистой желудка при язвенной болезни и малигнизированных язвах // Актуальные проблемы онкологии: Сб. науч. тр., посвященный 50-летию создания онкологической службы Воронежской области. Воронеж, 1997. С. 183.
3. Мозговой С. И., Новиков Д. Г., Кононов А. В. Оценка интегрального показателя атрофии слизистой оболочки при хроническом гастрите в прогнозе риска развития рака желудка // Омский науч. вестн. 2010. № 1. С. 80–83.
4. Меркулов Г. А. Курс патогистологической техники. Л., 1969.
5. Dixon M. F., Genta B. R., Yardley J. H., Correa P. Classification and Grading of Gastritis // Am. J. Surg. Pathol. 1996. Vol. 20, № 10. P. 1161–1181.
6. Rugge M., Correa P., Dixon M. F., Fiocca R., Hattori T., Lechago J., Leandro G., Price A. B., Sipponen P., Solcia E., Watanabe H., Genta R. M. Gastric Mucosal Atrophy: Interobserver Consistency Using New Criteria for Classification and Grading // Aliment. Pharmacol. Ther. 2002. Vol. 16. P. 1249–1259.

7. Ruge M., Genta R. M. Staging and Grading of Chronic Gastritis // Hum. Pathol. 2005. Vol. 36. P. 228–233.

8. Ruge M., Correa P., Di Mario F., El-Omar E., Fiocca R., Geboes K., Genta R. M., Graham D. Y., Hattori T., Malfertheiner P., Nakajima S., Sipponen P., Sung J., Weinstein W., Vieth M. OLGA Staging for Gastritis: A Tutorial // Dig. Liver Dis. 2008. Vol. 16, № 2. P. 150–154.

9. Аруин Л. И., Капуллер Л. Л., Исаков В. А. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника. М., 1998.

10. Кононов А. В., Мозговой С. И., Ливзан М. А., Предвечная И. К., Новикова Л. Д. Морфология поверхностного и атрофического гастрита при эрадикации *Helicobacter pylori* // Арх. патологии. 2005. Т. 67, № 3. С. 17–21.

11. Maeda S., Yoshida H., Mitsuno Y., Hirata Y., Ogura K., Shiratori Y., Omata M. Analysis of Apoptotic and Antiapoptotic Signalling Pathways Induced by *Helicobacter pylori* // Mol. Pathol. 2002. Vol. 55, № 5. P. 286–293.

12. Xia H. H., Zhang G. S., Talley N. J., Wong B. C., Yang Y., Henwood C., Wyatt J. M., Adams S., Cheung K., Xia B., Zhu Y. G., Lam S. K. Topographic Association of Gastric Epithelial Expression of Ki-67, Bax, and Bcl-2 with Antralization in the Gastric Incisura, Body, and Fundus // Am. J. Gastroenterol. 2002. Vol. 97, № 12. P. 3023–3031.

Материал поступил в редколлегию 10.05.2011

T. A. Ageeva, Yu. G. Maltseva, L. N. Chernova

PATHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE PROCESSES OF CELL RENEWAL IN THE GASTRIC MUCOSA IN PEPTIC ULCER DISEASE

When aggravation of gastric ulcer high level of proliferation (labeling index Ki-67) and apoptosis (labeling index p53) of epithelial cells are combined with the chaotic, but elevated labeling index of antiapoptotic bcl-2 gene in a wide area of the lesion of the mucous membrane. These markers reflect a violation of the processes of reparative regeneration of the gastric mucosa within periulcerous zone $R = 8$ cm.

Keywords: gastric ulcer disease, apoptosis, proliferation.