



М.Ю. Зак

ДУ «Інститут гастроентерології АМН України»,  
Дніпропетровськ

## Клітинне оновлення у слизовій оболонці шлунка у хворих на хронічний атрофічний гастрит

### Ключові слова

Хронічний атрофічний гастрит, індекс проліферації, індекс апоптозу.

Гастроканцерогенез є складним та багатофакторним процесом. Не викликає сумнівів той факт, що найбільш ефективна вторинна профілактика раку шлунка (РШ) полягає у ранній діагностиці передракових станів [2, 6]. Останні включають передракові захворювання та передракові зміни. Передракові захворювання створюють сукупність клініко-анатомічних умов, за яких ризик раку підвищений, передракові зміни — це морфологічно доведені зміни слизової оболонки (СО), що вірогідно свідчать про розвиток процесу у бік злоякісного росту. Основні передракові зміни СО шлунка (СОШ) є етапами «каскаду Корреа»: атрофія, кишкова метаплазія (КМ) і дисплазія епітелію [2, 8, 10].

Сьогодні переконливо доведено провідну роль інфекції *H. pylori* у розвитку передраку та РШ. Аналіз багатьох досліджень дав підстави Міжнародному агентству по дослідженню раку визнати *H. pylori* канцерогенним фактором I типу [7, 13, 15]. Встановлено, що більш ніж у 80 % випадків дистального РШ мало місце *H. pylori*-інфікування з розвитком хронічного гастриту [13]. Вважають, що у 30–50 % пацієнтів з гелікобактеріозом за відсутності ерадикації виникає атрофічний гастрит (АГ) [1].

Персистенція *H. pylori* у СОШ призводить до інтенсивної запальної реакції, яка може тривати протягом десятиліть [3]. Відповідна реакція СО на це — підвищення інтенсивності процесів клітинного оновлення (посилюється як апоптоз, так і проліферація). У зв'язку з цим змінюється експресія білків — маркерів апоптозу та проліферації [16]. Вплив *H. pylori* на клітинне відновлення

вивчено в багатьох дослідженнях: на людях, на експериментальних тваринах, *in vitro* на різних клітинних лініях, з яких найчастіше використовують лінії клітин РШ [11, 13]. На початкових етапах взаємодії *H. pylori* з епітеліальними клітинами переважає апоптоз, що є наслідком дії патогенних чинників мікроорганізму й продуктів запальної реакції хазяїна. Гіперпроліферативна реакція СО є наступним етапом у відповідь на колонізацію, вона зумовлена збільшеною експресією цикліну D1, циклінзалежного інгібітора кінази p16ink4a, p53 та зниженої експресії циклінзалежного інгібітора кінази p27kip1. Дисрегуляція гіперпроліферативної реакції може спричинити зростання ризику розвитку РШ [11].

Апоптоз — це процес, запуск якого відбувається у кілька стадій: прийом сигналу сприйняття рецепторами-месенджерами різного рівня — передача його на клітинне ядро — включення програми загибелі. Безпосередня реалізація апоптозу також відбувається в кілька етапів, що включають інтернуклеосомальну деградацію, маргінацію ядерного хроматину, формування випинань цитоплазми та апоптозних тіл — щільно упакованого ядерного хроматину, оточеного цитоплазматичною мембраною. Надалі апоптозні тілця фагоцитують тканинні макрофаги або навколишні клітини [4, 9, 18]. Однією з ключових ланок реалізації апоптозу в клітині є протеолітична активація каскаду каспаз — білків із сімейства цистеїнових протеаз, які специфічно розщеплюють білки в ділянках локалізації аспарагінової кислоти. Залежно від структурної гомології каспази поділяють на підродини: а) каспази-1 (каспази 1,

4, 5); б) каспази-2 (каспаза 2); в) каспази-3 (каспази 3, 6–10). Залежно від стадії апоптозу виділяють ініціаторні каспази (передають сигнал шляхом розщеплення білків) та ефекторні, які беруть участь у деградації ДНК клітини [12, 20].

Існує багато способів визначення клітин, які перебувають у стані апоптозу. «Золотим стандартом» діагностики є використання електронної мікроскопії з виявленням характерних картин, що відповідають стадіям апоптозу, зокрема виявлення фагоцитованих апоптозних тілець. Однак цей метод є трудомістким. На сьогодні існує понад 100 маркерів апоптозу, які виявляють імуногістохімічними методами. Більшість з них — це білки, залучені в різні етапи реалізації процесу клітинної загибелі. Для адекватного трактування отриманих результатів до вибору маркера для дослідження висувають суворі вимоги. Бажано, щоб маркер апоптозу свідчив не тільки про початок процесу, а й про його необоротність. Цим вимогам відповідають ефекторні каспази, найчастіше каспаза-3 [18, 20].

Проліферацію як параметр клітинного відновлення вивчали більш тривалий час порівняно з апоптозом. Поняття «темп проліферації» і «швидкість проліферації» можна застосовувати лише при вивченні живих клітин, бо їх оцінка заснована на здатності клітини до захоплення речовин, необхідних для синтезу ДНК в S-період клітинного циклу. До таких методик належить мітка тимідином, міченням тритієм, мітка бромдеоксиридином і дослідження ядерцевих організаторів у культурах клітин. Терміни «проліферативна активність» і «індекс проліферації» застосовують при вивченні параметрів клітинної кінетики в зрізах тканини (заморожених або залитих у парафін). Для цього проводять підрахунок мітотичного індексу, вивчення ядерцевих організаторів, виявлення специфічних антигенів клітинного циклу. Поява такої групи маркерів як антигени зумовлена можливістю одержувати моноклональні антитіла практично до будь-якого білка. Порівняльна простота й вірогідність цих методик зумовила їхній пріоритет у наукових дослідженнях. З антигенів, специфічних для клітинного циклу, найширше використовують PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) — ядерний антиген клітин, які проліферують. PCNA бере участь не тільки в проліферації клітин, а й у репарації ДНК, що може в деяких випадках призвести до помилкової позитивної мітки PCNA, оскільки репарація відбувається також у фазі спокою клітинного циклу (G0). Крім того, експресія гена PCNA може бути індукована факторами росту, а також онкогеном *myb* і антионкогеном *p53*, що є причиною неоднозначного тракту-

вання результатів його експресії. Великий період напівжиття білка сприяє виявленню мітки PCNA протягом деякого часу після виходу клітини з циклу. Надійнішим маркером для оцінки проліферації є білок Ki-67. Установлено, що його матрична РНК існує у двох ізоформах, кодуючи протеїни з молекулярною масою 320 і 359 кДа, що було встановлено при імуноблотингу. Ki-67 бере участь в організації структури хроматину. Є дані, що його роль у клітині полягає в реорганізації структури хроматину шляхом взаємодії з гетерохроматинним протеїном I. Показано, що експресія білка Ki-67 є необхідною для проходження фаз клітинного циклу. Цей білок не бере участі у механізмі репарації пошкоджень ДНК. Експресія Ki-67 починається у G1-період, потім зростає й різко знижується після закінчення мітозу. Крім того, розподіл цього білка відповідає локалізації мітки з бромдеоксиридином. Метод використання моноклональних антитіл до Ki-67 на парафінових зрізах робить цей маркер найбільш зручним для застосування в наукових дослідженнях [1, 4, 5, 9, 14, 19].

Порушення клітинного оновлення є одним з механізмів гастроканцерогенезу, тому визначення процесів проліферації та апоптозу у СОШ хворих на атрофію, КМ та дисплазію є актуальним завданням.

Мета — визначити стан процесів проліферації й апоптозу в СОШ у пацієнтів з передраковими змінами шлункового епітелію.

### Матеріали та методи

Аналіз процесів проліферації та апоптозу в СОШ проведено у 138 пацієнтів (у 91 жінки та 47 чоловіків) віком від 29 до 64 років (середній вік —  $46,02 \pm 3,92$ ) року). 38 хворих з хронічним неатрофічним гастритом (НАГ) склали групу I, 45 з хронічним АГ (рис. 1) — групу II, 30 з КМ (рис. 2) — групу III і 23 з дисплазією — групу IV. 20 осіб, яких, за даними морфологічного дослідження, визначено як здорові, ввійшли до контрольної групи.

Імуногістохімічне дослідження виконували на парафінових зрізах із застосуванням стрептавідин-біотинового методу (DAKO, Данія, LSAB2 Systems, HRP). Демаскування антигену проводили в цитратному буфері (рН 6,0). Як первинні антитіла використовували мишачі моноклональні антитіла: Ki-67, клон MIB-1 (DAKO, Данія); (каспаза-3), клон JHM62 (Novocastra, Велика Британія). Для моноклональних антитіл до каспази-3 використовували розведення 1 : 2, відповідно до рекомендацій фірми-виробника. Інші первинні антитіла мали маркування «готово до застосування» (ready to use), у зв'язку з чим роз-

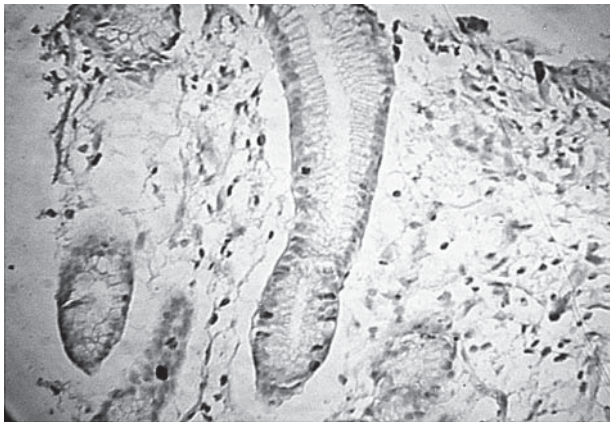


Рис. 1. Мікрофотографія гістологічного зрізу антрального відділу шлунка. Хронічний атрофічний гастрит, помірна запальна реакція. Імуногістохімічне забарвлення мітки Ki-67

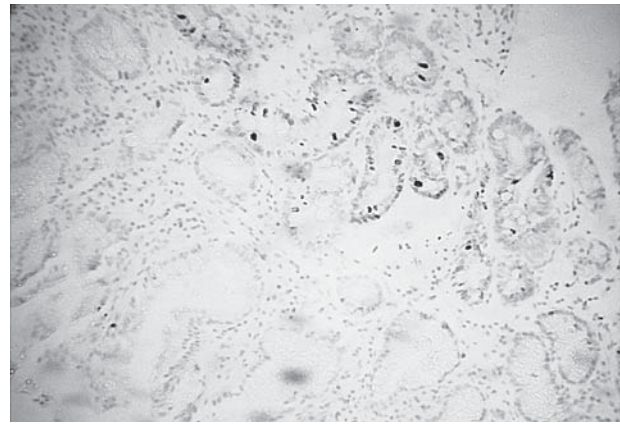


Рис. 2. Мікрофотографія гістологічного зрізу антрального відділу шлунка. Вогнища кишечної метаплазії на тлі хронічного атрофічного гастриту. Імуногістохімічне забарвлення мітки каспаза-3

ведення не проводили. Для візуалізації застосовували біотиліновані антитіла другого шару й стрептавідин, мічений пероксидазою, набір LSAB2 Systems, HRP (ДАКО, Данія). Як хромоген використовували 3,3-діамінобензидину тетрагидрохлорид, що входить у комерційний набір детекції, зазначений вище. Ядра клітин дофарбовували гематоксиліном за Майером.

При 400-разовому збільшенні мікроскопа визначали ядерну мітку Ki-67. Індекс проліферації (ІП) розраховували як частку позитивно пофарбованих ядер епітеліоцитів СОШ у межах проліферативного компартменту (верхня третина залоз, регіон перешийка й покривно-ямковий епітелій, де виявляється мітка при розширенні зони проліферації) у 5 випадково обраних полях зору (> 500 клітин).

Індекс апоптозу (ІА) (перинуклеарна або цитоплазматична мітка сrr32 – каспаза-3) визначали як частку позитивно пофарбованих епітеліоцитів у 10 випадково обраних полях зору (> 1000 клітин), оскільки «зона апоптозу» у СОШ розташована більш варіабельно, ніж зони проліферації.

Розподіл значень ІП та ІА в усіх групах не відповідав нормальному. У зв'язку з цим найбільш адекватним методом оцінки вірогідності різниці між вибірками є використання непараметричних критеріїв. Для непараметричної характеристики діапазону значень у вибірці використовували метод Смирнова – Колмогорова, для порівняння середніх показників у групах – медіанний критерій Вілкоксона.

### Результати та обговорення

**Стан процесів проліферації.** У пацієнтів з НАГ діапазон значень ІП становив від 12,1 до 49,0. Лише у 11 (28,9 %) пацієнтів діапазон ІП не відрізнявся від такого осіб з групи контролю (рис. 3), у решти хворих величина ІП була підвищеною ( $p(\lambda) < 0,001$ ) порівняно з групою контролю. Встановлено, що медіана ІП в I групі була у 2,2 разу вищою, ніж у контрольній групі (рис. 4).

ІП у пацієнтів з АГ мав діапазон від 15,2 до 63,0, а медіана становила 37,1. У всіх випадках ІП був вище, ніж у контрольній групі ( $p(\lambda) < 0,001$ ,  $p < 0,01$ ). Розподіл значень у варіаційному ряду та зна-

нявся від такого осіб з групи контролю (рис. 3), у решти хворих величина ІП була підвищеною ( $p(\lambda) < 0,001$ ) порівняно з групою контролю. Встановлено, що медіана ІП в I групі була у 2,2 разу вищою, ніж у контрольній групі (рис. 4).

ІП у пацієнтів з АГ мав діапазон від 15,2 до 63,0, а медіана становила 37,1. У всіх випадках ІП був вище, ніж у контрольній групі ( $p(\lambda) < 0,001$ ,  $p < 0,01$ ). Розподіл значень у варіаційному ряду та зна-

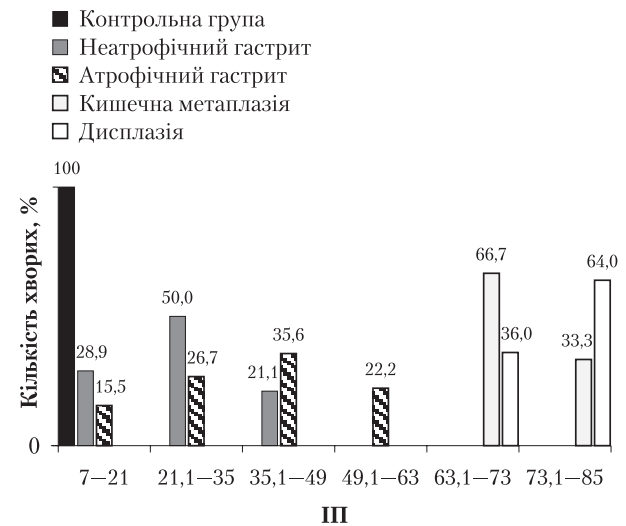


Рис. 3. Розподіл значень ІП у обстежених хворих

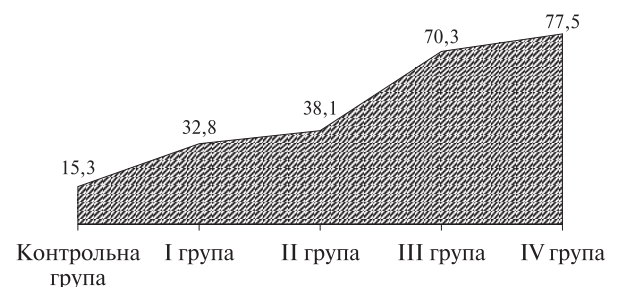


Рис. 4. Значення медіани ІП у обстежених хворих

чення медіани не мали істотних відмінностей від групи хворих з НАГ ( $p(\lambda) > 0,05$ ,  $p > 0,05$ ) (див. рис. 3, 4). Найбільш високі значення ІІ зафіксовані у вогнищах КМ та дисплазії шлункового епітелію — від 63,1 до 85,0. Медіана ІІ становила 70,3 у пацієнтів з КМ і 77,5 — у хворих з дисплазією ( $p > 0,05$ ). Розподіл значень ІІ у варіаційному ряду та значення медіани у хворих ІІ і ІІІ груп були вірогідно більшими, ніж у контрольній групі та у пацієнтів І, ІІ груп (відповідно  $p(\lambda) < 0,01$ ,  $p < 0,01$ ). Істотних відмінностей в ІІ між хворими ІІ і ІІІ груп не виявлено ( $p(\lambda) > 0,05$ ,  $p > 0,05$ ).

**Стан апоптозу.** У пацієнтів з НАГ показник ІА мав діапазон від 5,0 до 45,0 (рис. 5), а його медіана становила 30,8. Розподіл у варіаційному ряду та значення медіани при НАГ були вірогідно ( $p(\lambda) < 0,01$ ,  $p < 0,01$ ) більшими, ніж у групі контролю (рис. 5, 6).

У хворих з АГ значення ІА були у діапазоні від 21,1 до 53,0, а значення медіани становило 43,6. Визначено, що розподіл значень ІА у варіаційному ряду та медіана показника у хворих ІІ групи були вірогідно більші ( $p(\lambda) < 0,05$ ,  $p < 0,05$ ), ніж у пацієнтів І групи (див. рис. 5, 6).

Значення ІА у вогнищах КМ і дисплазії були у діапазоні від 53,1 до 79,0 (див. рис. 5). Показник медіани у пацієнтів ІІІ та ІІІІ груп становив 64,1 та 70,4 відповідно ( $p > 0,05$ ) (див. рис. 6). Розподіл значень ІА у варіаційному ряду та значення медіани у хворих на КМ та дисплазію були вірогідно ( $p(\lambda) < 0,001$ ,  $p < 0,01$ ) більші, ніж у хворих на НАГ та АГ.

Відомо, що канцерогенна ситуація розвивається у випадку, коли патологічна клітинна проліферація переважає над їхнім апоптозом. У низці робіт показано, що у пацієнтів з аденокарциномою ІІІ процеси проліферації (мітка Ki-67) значно переважали над апоптозом. В обстежених хворих з передраковими змінами СОШ середні значення ІІ і ІА істотно не відрізнялися (рис. 7). Це свідчить про те, що у пацієнтів з атрофією, КМ та дисплазією шлункового епітелію процеси проліферації і апоптозу збалансовані. Однак при атрофії апоптоз дещо переважає над проліферацією ( $p > 0,5$ ), а у вогнищах КМ та дисплазії, навпаки, проліферація дещо переважає над апоптозом ( $p > 0,5$ ) (див. рис. 7).

Таким чином, хронічний запальний процес та передракова перебудова СОШ супроводжуються підвищенням інтенсивності процесів проліферації і апоптозу. Значення ІІ та ІА прогресивно збільшуються у ряду незмінена слизова оболонка — поверхневий гастрит, атрофія, КМ та дисплазія. У вогнищах КМ та дисплазії зафіксоване значне ( $p(\lambda) < 0,01$ ,  $p < 0,01$ ) підвищення

ІІ та ІА порівняно з неатрофічним та атрофічним гастритами. Аналіз співвідношення ІІ і ІА свідчить про відсутність суттєвої різниці між ними у хворих відповідних груп. Але у пацієнтів з атрофією СОШ спостерігається незначне підвищення інтенсивності апоптозу ( $p > 0,5$ ), тоді як при КМ та дисплазії, навпаки, — підвищення інтенсивності проліферації ( $p > 0,5$ ).

Отримані дані обґрунтовують доцільність та перспективність використання індексів проліферації та апоптозу як маркерів прогнозування ризику розвитку передракових змін слизової обо-

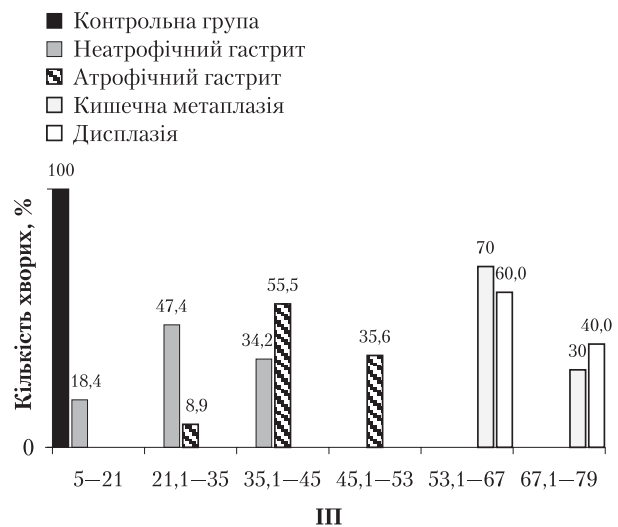


Рис. 5. Розподіл значень ІА в обстежених хворих

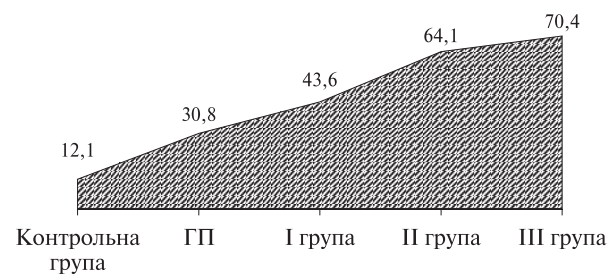


Рис. 6. Середні значення ІА у обстежених хворих

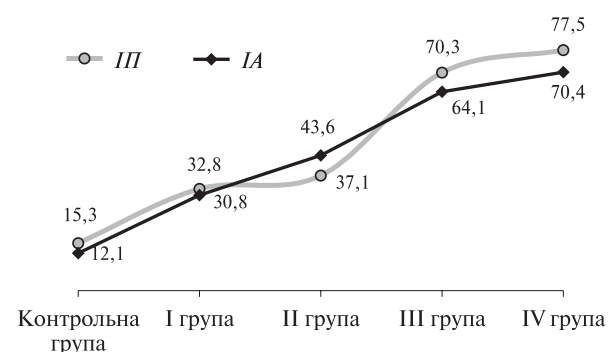


Рис. 7. Співвідношення ІІ та ІА у обстежених хворих

лонки шлунка у хворих на хронічний гастрит. Крім цього, індекси проліферації та апоптозу можуть бути застосовані як додаткові критерії ефективності лікування цієї категорії пацієнтів.

### Висновки

У слизовій оболонці шлунка спостерігається підвищення індексів проліферації та апоптозу відповідно до розвитку патологічних змін, визначених у каскаді Корреа.

Найвищі показники індексу проліферації зафіксовано у вогнищах кишкової метаплазії та

дисплазії: 70,3 та 77,5 відповідно ( $p < 0,05$ ), що було вірогідно більше ( $p < 0,01$ ), ніж у хворих на хронічний неатрофічний та атрофічний гастрити, — 32,8 та 37,1 відповідно ( $p > 0,05$ ).

Значення індексу апоптозу у вогнищах кишкової метаплазії та дисплазії становили 64,1 та 70,4 відповідно ( $p > 0,05$ ), а при неатрофічному та атрофічному гастритах — 30,8 та 43,6 відповідно ( $p < 0,05$ ).

У хворих з передраковими змінами слизової оболонки шлунка спостерігається збалансованість процесів проліферації та апоптозу.

### Список літератури

1. Аруин Л.И., Капуллер Л.Л., Исаков В.А. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника.— Триада-Х, 1998.— 496 с.
2. Бабак О.Я. Современные представления об оценке риска развития и профилактики рака желудка // Сучасна гастроентерол.— 2009.— № 6.— С. 62—66.
3. Денисов Н.Л., Ивашкин В.Т., Лобзин Ю.В., Голофеевский В.Ю. Хронический гастрит с позиций взаимодействия иммунного, инфекционного и морфологического факторов // Рос. журн. гастроентерол., гепатол., колопроктол.— 2008.— № 6.— С. 22—26.
4. Мозговой С.И., Ливзан М.А., Предвечная А.В. Проллиферативная и мутинпродуцирующая активность в участках кишечной метаплазии при хроническом атрофическом гастрите и язве желудка // Вестн. РАМН.— 2010.— № 7.— С. 15—8.
5. Осадчук А.М., Осадчук М.А., Кветной И. М. Роль маркеров клеточного обновления (BCL-2, KI-67) и апоптоза эпителиоцитов в возникновении опухолевых заболеваний желудка, ассоциированных с *H. pylori* // Клини. мед.— 2008.— № 5.— С. 13—22.
6. Филиппов Ю.А. Рак желудка. Ранняя диагностика и лечение // Гастроэнтерология: Міжвід. зб.— 2007.— Вип. 38.— С. 307—315.
7. Циммерман Я. С. Проблема хронического гастрита // Клини. мед.— 2008.— № 5.— С. 13—22.
8. Akiyama J., Uemura N. Intestinal metaplasia subtype and gastric cancer risk // J. Gastroenterol. Hepatol.— 2009.— N 24 (1).— P. 4—6.
9. Ashktorab H., Dashwood R.H., Dashwood M.M. *H. pylori*-induced apoptosis in human gastric cancer cells mediated via the release of apoptosis-inducing factor from mitochondria // Helicobacter.— 2008.— N 13 (6).— P. 506—517.
10. Correa P. A human model of gastric carcinogenesis // Cancer Res.— 1988.— Vol. 48.— P. 3554—3560.
11. Gan T., Kagaku R. Infection, inflammation and gastric cancer // Salud Publica Mex.— 2009.— Vol. 51 (5).— P. 427—433.
12. Jung J.T., Lee C.H., You S.S. Grading of histology, expression of apoptosis and cell proliferation in gastric mucosa adjacent to gastric adenoma or adenocarcinoma // Korean J. Gastroenterol.— 2005.— Vol. 46 (4) — P. 269—275.
13. Konturek P.C., Konturek S.J., Brzozowski T. Helicobacter pylori infection in gastric cancerogenesis // J. Physiol. Pharmacol.— 2009.— Vol. 60 (3).— P. 3—21.
14. Kotynia J., Kozłowska A. Gastric mucosal proliferative and total tyrosine kinases activities increase in Helicobacter pylori-induced chronic gastritis // Int. J. Gastrointest. Cancer.— 2005.— Vol. 36 (3).— P. 121—130.
15. Marusawa H. Mechanisms of *H. pylori* infection-induced gastric carcinogenesis // Gan To Kagaku Ryoho.— 2010.— Vol. 37 (1).— P. 23—27.
16. Pritchard D.M., Crabtree J.E. Helicobacter pylori and gastric cancer // Curr. Opin. Gastroenterol.— 2006.— Vol. 22 (6).— P. 620—625.
17. Sanchez-Zauco N.A., Giono-Cerezo S., Maldonado-Bernal C. Toll-like receptors, pathogenesis and immune response to Helicobacter pylori // Salud Publica Mex.— 2010.— Vol. 52 (5).— P. 447—454.
18. Targa A.C., Cesar A.C., Cury P.M., Silva A.E. Apoptosis in different gastric lesions and gastric cancer: relationship with Helicobacter pylori, overexpression of p53 and aneuploidy // Genet. Mol. Res.— 2007.— Vol. 30, N 6 (3).— P. 554—565.
19. Wang S.Y., Zhu T.F., Zhu H.G. Clonal analysis of gastric carcinoma and precancerous lesions and its relation to Ki-67 protein expression // Neoplasma.— 2009.— 56 (1).— P. 48—55.
20. Yang L., Wu D.Y., Xin Y. Down-regulation of caspase-3 expression in precancerous lesions and its relation to gastric carcinogenesis // Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.— 2006.— Vol. 28 (5).— P. 357—360.

М.Ю. Зак

## Клеточное обновление в слизистой оболочке желудка у больных хроническим атрофическим гастритом

У 138 пациентов с хроническим атрофическим гастритом и у 20 здоровых лиц проведен анализ показателей клеточного обновления (индекса пролиферации (ИП) (метка Ki-67) и индекса апоптоза (ИА) (метка каспаза-3)) в слизистой оболочке желудка. Установлено, что интенсивность процессов пролиферации и апоптоза прогрессивно увеличивается в ряду неизменной слизистой оболочки — неатрофический гастрит — атрофия — кишечная метаплазия — дисплазия. Наиболее высокие показатели ИП и ИА зафиксированы в очагах кишечной метаплазии и дисплазии. При атрофии слизистой оболочки желудка ИА несколько превышал ИП ( $p > 0,05$ ), а в очагах кишечной метаплазии и дисплазии, напротив, — ИП был незначительно выше ИА ( $p > 0,05$ ).

M.Yu. Zak

## Cellular regeneration of stomach mucosa in patients with chronic atrophic gastritis

The analysis of cellular regeneration indexes of gastric mucosa (proliferation index (mark Ki-67) and apoptosis index (caspase-3) has been carried out on 138 patients with chronic atrophic gastritis and 20 healthy subjects. It was established, that the intensity of proliferation and apoptosis processes progressively increased in the row from intact stomach mucosa – non-atrophic gastritis – atrophy – intestinal metaplasia and displasia. The highest rates of apoptosis index and proliferation index were recorded in the foci of intestinal metaplasia and displasia. In the cases of stomach mucosa atrophy the apoptosis index was somewhat higher than proliferation index ( $p > 0.05$ ), and in the foci of displasia the proliferation index was a little higher than apoptosis index ( $p > 0.05$ ).

---

### Контактна інформація

Зак Максим Юрійович, к. мед. н., ст. наук. співр.  
49074, м. Дніпропетровськ, просп. ім. газети «Правда», 96  
Тел./факс (56) 370-91-73

*Стаття надійшла до редакції 10 лютого 2011 р.*