

УДК 616.12-008.311.1:616.33-002.44:616.342

Курик О.Г., Ткаченко Р.П., Губар О.С., Баздирєв В.В.

## ІМУНОГІСТОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЛІФЕРАТИВНОЇ АКТИВНОСТІ ЕПІТЕЛІЮ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКУ ПРИ ХРОНІЧНОМУ АТРОФІЧНОМУ ГАСТРИТІ

Державна наукова установа «Науково-практичний центр профілактичної і клінічної медицини» Державного управління справами, м. Київ

Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, м. Київ

Медична клініка «Інновация», м. Київ

*У наш час не викликає сумнівів можливість прогресування хронічного хелікобактерного гастриту з атрофією слизової, розвитком метапластичних, диспластичних змін у рак шлунку. Важлива роль у прогресуванні порушень клітинного гомеостазу слизової оболонки шлунку (СОШ) належить білкам Ki-67 і Vcl-2, однак характер змін цих показників при прогресуванні хронічного гастриту вивчений недостатньо. Мета – визначити рівень експресії маркера проліферації Ki-67 і антиапоптозного білка Vcl-2 у СОШ при хронічному атрофічному хелікобактерному гастриті з кишковою метаплазією. У біоптатах 30 випадків з хелікобактерним хронічним атрофічним гастритом (ХАГ) з кишковою метаплазією і 20 з хронічним неатрофічним гастритом проведено імуногістохімічне (ІГХ) визначення маркерів проліферативної активності Ki-67 (DAKO, SP6) і інгібітора апоптозу Vcl-2 (VCL-2 alpha Ab -1). При хронічному неатрофічному гастриті відсоток імунопозитивних клітин склав в антральному відділі 28,8±7,2; в ділянці кута – 30,6±6,4; в тілі шлунку – 26,8±8,3. При ХАГ- в антральному відділі – 48,6±8,4, в ділянці кута – 44,8±7,6, в тілі – 46,2±6,8 (p<0,05). Експресія Vcl-2 при хронічному неатрофічному гастриті становила 2,15±0,22; в ділянці кута – 1,98±0,14; в тілі шлунку – 1,86±0,32. При ХАГ експресія Vcl-2 склала в антральному відділі – 18,62±2,4, в ділянці кута – 16,86±2,60, в тілі – 16,28±1,8 (p<0,05). Отже, при ХАГ з кишковою метаплазією виявляється вірогідне підвищення експресії протеїну Ki-67 і інгібітора апоптозу Vcl-2 в епітеліоцитах СОШ у порівнянні з хронічним неатрофічним гастритом, що вказує на порушення процесів клітинного оновлення із виникненням передракових змін в СОШ.*

Ключові слова: хронічний атрофічний гастрит, кишкова метаплазія, протеїн Ki-67, протеїн Vcl-2.

*Дослідження виконане в рамках комплексної НДР «Удосконалення малоінвазивних методів хірургічного лікування окремих захворювань судин, внутрішніх та репродуктивних органів, черевної стінки, носоглотки, щитоподібної та прищитоподібних залоз і суглобів, зокрема із використанням імплантатів на основі нанобіосенсорних технологій», № держ. реєстрації 0114U002120.*

В наш час не викликає сумнівів можливість прогресування хронічного хелікобактерного гастриту з атрофією слизової оболонки шлунку (СОШ), розвитком метапластичних і диспластичних змін у рак шлунку [5,8,9]. Відомо, що персистенція *H. pylori* у СОШ викликає інтенсивну та тривалу запальну реакцію. Запалення слизової оболонки шлунку (СОШ), індуковане *H. pylori*, супроводжується підвищенням проліферативного потенціалу і апоптозу, у зв'язку з цим змінюється експресія білків — маркерів апоптозу та проліферації [7,9]. Важлива роль у прогресуванні порушень клітинного гомеостазу СОШ належить маркеру проліферуючих клітин Ki-67, білку Vcl-2, що виконує функцію захисту клітин від апоптозу, і білку p53, що стимулює апоптоз. В нормі індекс проліферації значно вищий за індекс апоптозу. За таких умов зберігається рівновага між новоутворенням і загибеллю клітин. Переважання апоптозу над мітозами призводить до атрофії; недостатність апоптозу може призводити до гіперплазії і злоякісного росту [7].

Порушення клітинного оновлення є одним з механізмів гастроанцирогенезу, тому визначення процесів проліферації та апоптозу у СОШ при ХАГ, зокрема при кишковій метаплазії, є важливим в плані прогнозування можливої малігнізації [1,5]. Підвищення проліферативної активності, зниження швидкості диференціації клітин шлун-

кового епітелію в процесі постійного оновлення епітеліального шару при хронічному атрофічному гастриті (ХАГ) є основою дисбалансу між сполучнотканинними та залозистими структурами СОШ [2].

Рутинні методи обстеження в більшості випадків не забезпечують ранню діагностику та виявлення передракових змін СОШ в повному обсязі, тому на даний момент пошук більш чутливих та високоспецифічних методів, що базуються на виявленні клітинних маркерів проліферації та апоптозу в СОШ є актуальною темою. Дослідження експресії маркерів Ki-67, Vcl-2, p53 представлено в ряді робіт вітчизняних [1,2,3,4] та зарубіжних авторів [6,7,10,11,12], однак ці дані не завжди співпадають, особливо це стосується маркера Vcl-2. У більшості робіт визначення показників проліферативної активності і апоптозу проводиться в слизовій антрального відділу шлунку, і лише в поодиноких роботах ці показники враховуються у слизовій фундального відділу [4,6].

### Мета роботи

Визначити особливості проліферації епітелію за даними експресії маркера проліферації Ki-67 і антиапоптозного білка Vcl-2 у СОШ при ХАГ.

**Матеріали і методи дослідження**

Досліджували гастробіоптати 50 пацієнтів – 30 з ХАГ з кишковою метаплазією і 20 пацієнтів з хронічним неатрофічним гастритом. Для дослідження обирали пацієнтів з гастритом як антрального відділу, так і тіла шлунку. Пацієнти були віком від 27 до 56 років (середній вік  $42,36 \pm 4,18$  років). Гастробіоптати отримували в процесі фіброезофагогастродуоденоскопії (ФЕГДС) по 2 біоптати з антрального відділу і тіла шлунку та 1 з ділянки кута шлунку згідно вимог модифікованої Сіднейської системи. Біопсійний матеріал фіксували у 10% розчині нейтрального формаліну. Для проводки матеріалу після фіксації використовували гістопроцесор карусельного типу STP-120, для заливки парафінових блоків станцію ЕС-350, для різання парафінових блоків - ротаційний мікротом серії НМ - 340Е (Microm, Hamburg, Germany). Зрізи товщиною 4-5 мкм зафарбовували гематоксиліном-еозином та за Романовським-Гімзою для виявлення *H. pylori*. Використовували мікроскоп Axioskop 40 з фотокамерою AxioCam MRc5 (CarlZeiss).

Імуногістохімічне (ІГХ) дослідження виконували на парафінових зрізах; проводили визначення експресії маркерів проліферативної активності Ki-67 (DAKO, SP6) та інгібітора апоптозу Bcl-2 (BCL-2 alpha Ab -1), а також системи візуалізації EnVision FLEX (DAKO) з діамінобензидіном (ДАБ).

Проводили висушування парафінових зрізів при температурі + 65°C впродовж 30-40 хв., депарафінізацію у ксилолі (2-5 хв.), регідратацію і відновлення антигену в цитратному буфері (рН=6.0) з використанням РТ-модуля (20 хв. при температурі 95°C), пероксидазний блок (2 хв.),

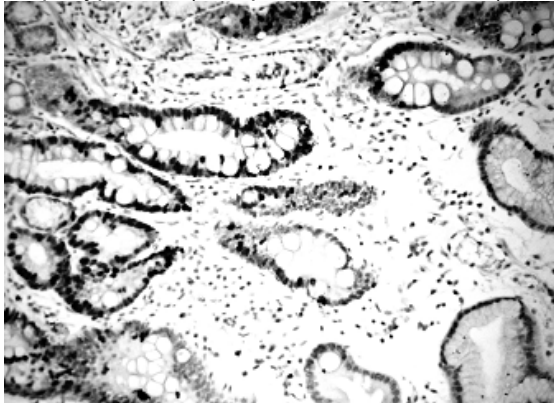


Рис. 1. Експресія ядрами епітеліальних клітин СОШ білка Ki-67. ХАГ. Імуногістохімічне дослідження. х400.

Експресія Ki-67 виявлена в ділянках шлечних відділів шлункових залоз - проліферативного компартмента. При хронічному неатрофічному гастриті відсоток імунопозитивних клітин склав в антральному відділі  $28,8 \pm 7,2$ ; в ділянці кута –  $30,6 \pm 6,4$ ; в тілі шлунку –  $26,8 \pm 8,3$ . При ХАГ з кишковою метаплазією - в антральному відділі -  $48,6 \pm 8,4$ ; в ділянці кута –  $44,8 \pm 7,6$ ; в тілі –  $46,2 \pm 6,8$  ( $p < 0,05$ ). Отже, проліферативна активність епітелію СОШ за даними експресії Ki-67 ві-

інкубацію з первинними антитілами (30 хв.), інкубацію з вторинними антитілами, кон'югованими з HR-полімером (20 хв.), інкубацію з DAB + хромоген (2 хв.), контрастування гематоксиліном Майера (12 с). Продуктом ІГХ реакцій є дрібні коричневі гранули в ділянках локалізації антигену. Для Ki-67 - це ядра клітин, для Bcl-2 - цитоплазма і ядра клітин.

Оцінку результатів проводили при 400-разовому збільшенні мікроскопа. Кількість Ki-67 і Bcl-2 імунопозитивних ядер клітин підраховували у 5 випадково обраних полях зору як відношення площі з імунопозитивними клітинами до загальної площі клітин в полі зору (у %).

**Результати дослідження та їх обговорення**

При хронічному неатрофічному гастриті з 20 досліджених випадків в 10 (50,0%) відзначалася наявність лімфоїдних фолікулів в стромі слизової шлунку; в 6 (30,0%) випадках гастрит був активним (1 ступінь активності запального процесу). У 12 пацієнтів (60,0%) був визначений слабкий ступінь колонізації, у 6 (30,0%) – середній і у 2 (10,0%) - високий ступінь колонізації *H. pylori*. У групі хронічного гастриту з метапластичною атрофією з 30 випадків в 16 (54,4%) визначалася повна (тонкокишкова) метаплазія епітелію, в 7 випадках (23,3%) - неповна (товстокишкова), в 7 випадках (23,3 %) визначалося поєднання повної та неповної кишкової метаплазії. Активними були 12 випадків (40,0%) хронічного атрофічного метапластичного гастриту. Лімфоїдні фолікули в стромі спостерігалися в 11 (36,7%) біоптатів. У 8 (26,7%) випадках був діагностований слабкий ступінь колонізації, в 12 (40,0%) середній і в 10 (33,3%) - високий ступінь колонізації *H. pylori*.

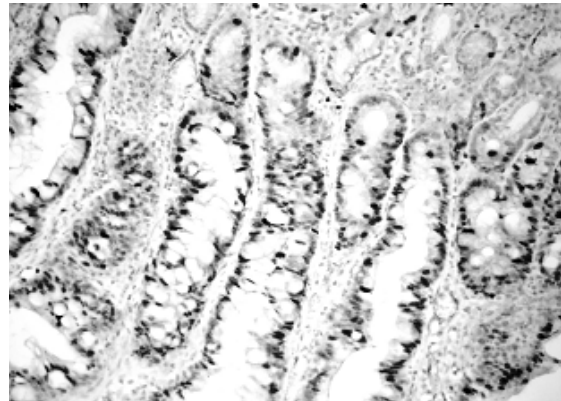


Рис. 2. Експресія інгібітора апоптозу bcl-2 в епітеліальних клітинах СОШ. Імуногістохімічне дослідження. х400.

рогідно збільшується у пацієнтів з атрофічним метапластичним гастритом у порівнянні з неатрофічним гастритом, що співпадає з даними досліджень більшості авторів [1,2,3,4,6,7,11,12].

Експресія Bcl-2 при хронічному неатрофічному гастриті становила  $2,15 \pm 0,22$ ; в ділянці кута –  $1,98 \pm 0,14$ ; в тілі шлунку –  $1,86 \pm 0,32$ . При ХАГ з кишковою метаплазією експресія Bcl-2 склала в антральному відділі -  $18,62 \pm 2,4$ , в ділянці кута –  $16,86 \pm 2,60$ , в тілі –  $16,28 \pm 1,8$  ( $p < 0,05$ ). Таким чи-

ном, при ХАГ відмічається вірогідне зростання експресії білка Bcl-2 в епітелії СОШ у порівнянні з показниками при хронічному неатрофічному гастриті. Отримані результати співпадають з даними ряду авторів [4,6] і протирічать даним авторів, які не спостерігали помітної активації антиапоптичних механізмів за експресією Bcl-2 в епітеліоцитах СОШ, що опосередковано може вказувати на відсутність посиленого апоптозу в СОШ [1,2]. Автори роблять висновок, що експресія Bcl-2 загалом не є характерною для шлункового епітелію, оскільки оновлення в СОШ відбувається досить швидко і забезпечення тривалого виживання клітин не є необхідним; вони відмічають, що маркування Bcl-2 відзначалось лише в клітинах запального інфільтрату та лімфатичних фолікулах, а не у епітелії СОШ [1,2]. Наші дані узгоджуються з даними авторів, які відмічають, що при захворюваннях шлунку, асоційованих з *H. pylori* відмічається значне збільшення вектору проліферативної і антиапоптозної активності [4] (рис. 1, 2).

### Висновки

При ХАГ показники експресії маркерів проліферації Ki-67 і інгібітору апоптозу Bcl-2 вірогідно перевищували такі при хронічному неатрофічному гастриті як в антральному, так і в фундальному відділах, що свідчить про наявність порушень процесів клітинного оновлення при ХАГ, які в подальшому можуть призводити до розвитку раку шлунку.

### Перспективи подальших досліджень

Отримані дані дають можливість використовувати

ти ці маркери як показники ризику розвитку передракових змін СОШ у пацієнтів з ХАГ.

### Література

1. Вернигородський С. В. Клітинне оновлення в ділянках кишкової метаплазії слизової оболонки шлунку при передракових станах / С.В. Вернигородський, Л.В. Дегтярьова // Світ біології і медицини. - 2012. - №4. - С. 64-70.
2. Вернигородський С. В. Проліфераційна активність шлункового епітелію при хронічному атрофічному гастриті / С.В. Вернигородський // Biomedical and Biosocial Anthropology. - 2014. - № 23. - С. 187-191.
3. Зак М. Ю. Клітинне оновлення у слизовій оболонці шлунка у хворих на хронічний атрофічний гастрит / М.Ю. Зак // Сучасна гастроентерологія. - 2011. - №2(58). - С. 27-31.
4. Осадчук А. М. Роль маркерів клітинного оновлення (BCL-2, Ki-67) і апоптоза епітеліоцитів в возникновении опухолевых заболеваний желудка, ассоциированных с *Helicobacter pylori* / А. М. Осадчук, М. А. Осадчук, И. М. Кветной // Клиническая медицина. - 2008. - Т. 86, № 5. - С. 33-38.
5. Akiyama J. Intestinal metaplasia subtype and gastric cancer risk / J. Akiyama // J. Gastroenterol. Hepatol. - 2009. - № 24 (1). - P. 4-6.
6. Erkan G. Evaluation of apoptosis along with BCL-2 and Ki-67 expression in patients with intestinal metaplasia / G. Erkan, I. Gonul, U. Kandilci, A. Dursun // Pathol. Res. Pract. - 2012. - Vol. 208. - P. 89-93.
7. Hegazi A. P53 protein and Ki-67 expression in chronic gastritis patients with positive *Helicobacter pylori* infection / A. Hegazi, E. Hassan, K.A. El-Atrebi, H.T. El-Bassyouni // J. Genetic Eng. Biotechnol. - 2011. - Vol. 9 (1). - P. 73-76.
8. Konturek P.C. *Helicobacter pylori* infection in gastric carcinogenesis / P.C. Konturek, S.J. Konturek, T. Brzozowski // J. Physiol. Pharmacol. - 2009. - Vol. 60(3). - P. 3-21.
9. Penta R. *Helicobacter pylori* and gastric epithelial cells: from gastritis to cancer / R. Penta, M. De Falco, G. Iaquinio, A. De Luca // J. Exp. Clin. Cancer Res. - 2005. - Vol. 24, № 3. - P. 337-345.
10. Petersson F. Characterization of the gastric cardia in volunteers from the general population. Type of mucosa, *Helicobacter pylori* infection, inflammation, mucosal proliferative activity, p53 and p21 expression, and relations to gastritis / F. Petersson, L. E. Franzén, K. Borch // Dig Dis Sci. - 2010. - Vol. 55 (1). - P. 46-53.
11. Saf C. Assessment of p21, p53 expression, and Ki-67 proliferative activities in the gastric mucosa of children with *Helicobacter pylori* gastritis / C. Saf, E.M. Gulcan, F. Ozkan // Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. - 2015. - Vol. 27 (2). - P. 155-161.
12. Zheng Y. Expression of p53, c-erbB-2 and Ki67 in intestinal metaplasia and gastric carcinoma / Y. Zheng, L. Wang, J.P. Zhang [et al] // World J Gastroenterol. - 2010. - Vol. 16. - P. 339-344.

### Реферат

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ЭПИТЕЛИЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ АТРОФИЧЕСКОМ ГАСТРИТЕ

Курик Е.Г., Ткаченко Р.П., Губар А.С., Баздырев В.В.

Ключевые слова: хронический атрофический гастрит, кишечная метаплазия, протеин Ki-67, протеин Bcl-2.

В настоящее время не вызывает сомнений возможность прогрессирования хронического хеликобактерного гастрита с атрофией слизистой, развитием метапластических, диспластических изменений в рак желудка. Важная роль в прогрессировании нарушений клеточного гомеостаза слизистой оболочки желудка (СОЖ) принадлежит белкам Ki-67 и Bcl-2, однако характер изменений этих показателей при прогрессировании хронического гастрита изучен недостаточно. Цель - определение уровня экспрессии маркера пролиферации Ki-67 и антиапоптозного белка Bcl-2 в СОЖ при хроническом атрофическом хеликобактерном гастрите с кишечной метаплазией. В образцах биопсий 30 пациентов с ХАГ с метаплазией и 20 пациентов с хроническим неатрофическим гастритом проведено иммуногистохимическое исследование (ИГХ) для определения уровня экспрессии маркеров пролиферации Ki-67 (DAKO, SP6) и ингибитора апоптоза Bcl-2 (BCL-2alphaAb -1). Экспрессия Ki-67 была обнаружена в отделах шеечных мукоцитов, что соответствует пролиферативному компартменту СОЖ. При хроническом неатрофическом гастрите процент иммунопозитивных клеток составил в антральном отделе 28,8±7,2; в области угла желудка - 30,6±6,4; в теле желудка - 26,8±8,3. При ХАГ - в антральном отделе - 48,6±8,4; в области угла - 44,8±7,6; в теле - 46,2±6,8 (p<0,05). Экспрессия Bcl-2 при хроническом неатрофическом гастрите составила в антральном отделе 2,15±0,22; в области угла желудка - 1,98±0,14; в теле - 1,86±0,32. При ХАГ экспрессия Bcl-2 была установлена в антральном отделе - 18,62±2,4, в области угла желудка - 16,86±2,60, в теле - 16,28±1,8 (p<0,05). Таким образом, при ХАГ с кишечной метаплазией показатели экспрессии маркеров пролиферации Ki-67 и ингибитора апоптоза и Bcl-2 достоверно превышали такие при хроническом неатрофическом гастрите, что свидетельствуют о наличии нарушений процессов клеточного обновления при ХАГ, которые в дальнейшем могут приводить к развитию рака желудка.

### Summary

IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF PROLIFERATIVE ACTIVITY OF GASTRIC MUCOSA IN CHRONIC ATROPHIC GASTRITIS

Kuryk O.G., Tkachenko R.P., Gubar O.S., Bazdyriev V.V.

Key words: chronic atrophic gastritis, intestinal metaplasia, protein Ki-67, protein Bcl-2.

Nowadays due to identification of *Helicobacter pylori* as a factor of precancerous condition of gastric mucosa we have a possibility to prevent the development of cancer with detection of pathological changes causing irregularity of cells renewal and development of neoplastic transformation. This transformation is associated with the nuclear protein Ki-67, an inhibitor of apoptosis Bcl-2 and apoptosis in whole. The aim of the study was to detect the level of expression of Ki-67 as a proliferation marker and Bcl-2 as an inhibitor of apoptosis in chronic atrophic gastritis with intestinal metaplasia. 30 biopsy specimens of gastric mucosa taken from patients with chronic helicobacter-associated gastritis with intestinal metaplasia and 20 specimens taken from patients with chronic non-atrophic gastritis were subjected to immunohistochemical investigations to detect the expression of Ki-67(DAKO, SP6) and Bcl-2( BCL-2, alpha Ab-1). In chronic gastritis without atrophy the percentage of cells expressing Ki-67 in the antral part made up  $28,8 \pm 7,2$ ; in the angle -  $30,6 \pm 6,4$ ; in the body of stomach -  $26,8 \pm 8,3$ . The percentage of cells expressing Ki-67 in chronic atrophic gastritis in the antral part made up  $48,6 \pm 8,4$ , in the angle -  $44,8 \pm 7,6$ , in the body of the stomach -  $46,2 \pm 6,8$  ( $p < 0,05$ ). The level of BCL-2 expression in non-atrophic gastritis was lower and the number of immunopositive cells in the antral part was  $2,15 \pm 0,22$ ; in the angle -  $1,98 \pm 0,14$ ; in the body of the stomach -  $1,86 \pm 0,32$ . In chronic atrophic gastritis BCL-2 expression was found in the antral part -  $18,62 \pm 2,4$ , in the angle -  $16,86 \pm 2,60$ , in the body of the stomach -  $16,28 \pm 1,8$ . Therefore, the raise of expression of markers of proliferation and apoptosis (Ki-67, Bcl-2 accordingly) in chronic atrophic helicobacter-associated gastritis with intestinal metaplasia confirms the impairment of cells regeneration and the presence of precancerous condition of gastric mucosa.

УДК 616.72-002.1-577.11:571.27

**Маколінець К.В., Маколінець В.І., Морозенко Д.В., Глебова К.В.**

### **БІОХІМІЧНІ ТА ІМУНОЛОГІЧНІ МАРКЕРИ СИРОВАТКИ КРОВІ У ХВОРИХ НА РАННІХ СТАДІЯХ ГОНАРТРОЗУ**

ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М.І. Ситенка НАМН України»

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

*У статті розглянуто питання діагностики метаболічних порушень стану сполучної тканини уражених суглобів та імунний статус хворих на I-II стадіях гонартрозу на основі лабораторних маркерів сироватки крові. За результатами дослідження біохімічних маркерів у сироватці крові хворих на I-II стадіях гонартрозу було встановлено збільшення вмісту глікопротеїнів – на 55 %, сіалових кислот – 54,7 %, хондроїтинсульфатів – у 3,3 рази, хондроїтин-6-сульфату – на 40 % порівняно із показниками у клінічно здорових осіб, що свідчить про присутність запально-деструктивних змін у колінних суглобах на ранніх стадіях хвороби. Збільшення кількості циркулюючих імунних комплексів у крові хворих на гонартроз на 97,9 % порівняно з клінічно здоровими особами вказує на активізацію компенсаторних механізмів видалення антигенів, які утворюються внаслідок деградації хрящової тканини колінних суглобів на ранніх стадіях гонартрозу. Проаналізувавши біохімічні маркери стану сполучної тканини і імунологічні тести можна відзначити, що вони віддзеркалюють перебіг запально-деструктивних процесів в колінних суглобах у пацієнтів з гонартрозом.*

Ключові слова: гонартроз, глікопротеїни, хондроїтинсульфати, сіалові кислоти, глікозаміноглікани, імуноглобуліни, циркулюючі імунні комплекси.

*Дослідження проводилося в рамках науково-дослідної роботи "Вивчити вплив комплексного застосування низькоінтенсивного інфрачервоного лазерного випромінювання та медичних препаратів на перебіг остеоартрозу", № держ. реєстрації 0108U000391.*

#### **Вступ**

Діагностика гонартрозу у сучасній ортопедії базується на комплексному обстеженні пацієнта, яке включає клінічні, інструментальні та лабораторні дослідження [1,2,3]. Первинний діагноз частіше за все базується на результатах клінічного дослідження та даних рентгенографії уражених суглобів. Однак рентгенографія не дозволяє встановити істинний характер ураження хряща та стан синовії, що змушує фахівців застосову-

вати більш сучасні та інформативні методи діагностики – ультразвукове дослідження, комп'ютерну та магнітно-резонансну томографію і артроскопію [4,5,6]. Окрім клінічних та інструментальних методів діагностики остеоартрозу, важливе значення у діагностиці гонартрозу мають показники обміну колагену і протеогліканів [7]. Вони є важливими біохімічними маркерами стану хрящової та кісткової тканини, дозволяють оцінити ступінь, глибину та перебіг запально-деструктивних порушень у суглобах при остеоа-