

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТЬЮ КЛЕТОК СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА И ОБСЕМЕНЕННОСТЬЮ *HELICOBACTER PYLORI* У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЖЕЛУДКА

Р.Г. Сайфутдинов, З.М. Галева, Т.А. Велижнская, П.А. Максимов

Кафедра терапии (зав. – проф. Р.Г. Сайфутдинов) Казанской государственной медицинской академии последипломного образования, Республиканская клиническая больница № 2 (главврач – Р.З. Абашев), Клинический онкологический диспансер (главврач – проф. Р.Ш. Хасанов) МЗ РТ, г. Казань

Хронические заболевания желудка (хронический гастрит типа В, язвенная болезнь желудка – ЯБЖ) являются наиболее частыми заболеваниями желудочно-кишечного тракта у лиц трудоспособного возраста, оставаясь одной из основных проблем в гастроэнтерологии [4].

В РФ язвенной болезнью (ЯБ) страдают 8–10% населения. В 2003 г. заболеваемость ЯБ составляла 1268,9 случая на 100 тысяч человек, при этом наибольшая зарегистрирована в Приволжском Федеральном округе – 1423,4 на 100 тысяч населения. Считается, что у 90–95% больных ЯБ развивается на фоне гастрита, вызванного инфекцией *Helicobacter pylori* (НР). [4, 6]. Получены веские доказательства в пользу определения НР как главного фактора риска развития рака желудка (РЖ). Массовый скрининг, выполняемый в популяциях, выявляет лишь 7–8% случаев РЖ. Без комбинации с другими методами исследования биопсия адекватно диагностирует его только в 80% случаев [9]. Кроме того, наличие ульцеративного варианта РЖ создает дополнительные дифференциально-диагностические трудности. При хронической язве желудка малигнизация возникает в 11–20% случаев. Особо следует обратить внимание на лиц с "зарубцевавшимися язвами" желудка, так как в последние годы увеличилось число больных, у которых морфологически выявлен рак в заэпителизованных "язвах", при которых явных эндоскопических признаков малигнизации не определялось [5]. На сегодняшний день прогнозирование клинического течения хронической НР инфекции затруднено вследствие влияния множества факторов. У ряда пациентов отмечается бессимптомная картина хронического гастрита типа В, у других развивается ЯБЖ. Кроме того, их длительное течение приводит к развитию атрофии

слизистой с последующими предраковыми и раковыми изменениями. Ассоциация НР с развитием аденокарциномы желудка обуславливает возможность профилактики канцерогенеза на различных его этапах, в частности путем проведения эрадикационной терапии [2, 6]. При этом необходимо решить две задачи: первая – идентификация критериев высокого риска развития аденокарциномы, которые могут быть использованы при отборе лиц для скрининга НР инфекции, вторая – мониторинг НР-положительных пациентов (НР+) с пренеопластическими изменениями (тяжелая степень атрофии, кишечная метаплазия) [7–8].

Целью исследования являлось изучение плоидности и пролиферативной активности клеток слизистой оболочки желудка и их взаимосвязи с НР у больных с хроническими заболеваниями желудка до и после проведения эрадикационной терапии.

Обследовано 125 пациентов с хроническими заболеваниями желудка (85 мужчин и 40 женщин), средний возраст мужчин – 41,3±5,6, женщин – 39,1±3,5 года.

Скрининг НР по титру антител (АТ) IgG, оценку уровней гастрин-17 (G-17) и пепсиногена-I (PG-I) осуществляли методом ИФА тест-системой ("Biohit Gastro-Panel", Финляндия). Количественные значения параметров анализировали с помощью прилагаемой к ней программы "Gastro Soft". ФГДС ("Fuginon", Япония) проводили всем пациентам утром натощак, биоптаты брали из антрального отдела (АО), тела желудка, с края язвенного дефекта и отступом на 3 см от края язвенного дефекта в случае его обнаружения. Полученный материал делили на 4 части: для иммуногистохимического, гистологического, проточноцитофлуориметрического (ПЦ) методов и СЛО-теста.

Фрагменты слизистой оболочки фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине в течение 12–24 часов, заливали в парафин. Срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилин-эозином. Оценку морфологических изменений слизистой обо-

Таблица 1

**Результаты морфологической оценки СОЖ у НР (+)
пациентов в эндоскопических группах**

Эндоскопическая группа	Всего пациентов	Эндоскопическое заключение	Гистологическое заключение							Всего заключений
			норма	поверхностный гастрит	атрофический гастрит	метаплазия		дисплазия	рак	
						тонкокишечная	толстокишечная			
I	4	Нормальная слизистая	1	2	–	1	–	–	–	4
II	42	Гастрит	–	28	6	3	2	3	–	42
III	35	Язвенная болезнь	–	30	5	2	–	3	3	43
IV	16	Предполагаемый рак	–	–	–	–	4	12	16	32
Всего пациентов	97	Всего заключений	1	60	11	6	6	18	19	121

Таблица 2

**Результаты морфологической оценки СОЖ у НР (–)
пациентов в эндоскопических группах**

Эндоскопическая группа	Всего пациентов	Эндоскопическое заключение	Гистологическое заключение							Всего заключений
			норма	поверхностный гастрит	атрофический гастрит	метаплазия		дисплазия	рак	
						тонкокишечная	толстокишечная			
I	8	Нормальная слизистая	7	–	–	1	–	–	–	8
II	10	Гастрит	–	6	4	2	–	–	–	12
III	5	Язвенная болезнь	–	3	2	–	1	1	1	8
IV	5	Предполагаемый рак	–	–	5	–	3	5	5	18
Всего пациентов	28	Всего заключений	7	9	11	3	4	6	6	46

лочки желудка осуществляли по визуально-аналоговой шкале (модифицированная Сиднейская система).

Иммуногистохимическое исследование выполняли на парафиновых срезах с применением стрептавидин-биотинового метода используя готовые антитела ("ДАКО", Дания). ДНК анализ методом ПЦ проводили в соответствии с методическими рекомендациями Европейского консенсуса по проточной цитометрии ДНК на цитометре модели "Facs Calibu" с двумя лазерами 488 и 635 нм ("Becton Dickinson", США) [12]. Ткани гомогенизировали (Medimachine System, BD), суспензию пропускали через фильтр Filcon (BD) с размером пор 50 мкм и окрашивали используя набор Cycle-TEST™ Plus DNA reagent (BD). Контрольные образцы клеток обрабатывали аналогично диагностическим. Для калибровки, тестирования функции разделения дублетов и оценки коэффициента вариации применяли набор "DNA QC Particles". При настройке прибора для анализа партии образцов использовали 2 вида контролей: внешний – диплоидный контроль – суспензию мононуклеаров периферической крови, выделенных центрифугированием, и внутренний – интактную слизистую желудка. Первичные файлы записывали в программе "CellQuest" со скоростью не более 300 событий в секунду, запоминали не менее 50000 событий. Полученные гистограммы анализировали в программе "ModFit". Вычисляли коэффициент основного пика (CV), индекс ДНК (и-ДНК), равный отношению содержания ДНК клеток диагностичес-

кого образца в фазе G0–G1, к содержанию ДНК клеток интактной слизистой желудка в фазе G0–G1, а также S-фракцию клеточного цикла. За нормальные показатели принимали следующие значения: S-фракция – 5–8%, диплоидный тип гистограммы с и ДНК – 1,0 и отсутствие анеуплоидных клеток. В случаях выявления анеуплоидии использовали критерий анеуплоидии, рекомендуемый Американским и Европейским консенсусами по ПЦ ДНК, согласно которому наличие 2 различных G0–G1 пиков, имеющих восходящий и нисходящий компоненты и минимум 5–10% клеток в анеуплоидном пике с индексом ДНК <0,95 или >1,05 [12].

Статистическая обработка результатов производилась с использованием пакета прикладных программ Statistica.

Пациенты после морфологической верификации состояния слизистой оболочки желудка и определения НР (данные ИФА, иммуногистохимический метод и СЛО-тест) были разделены на 2 группы: основную – 97 лиц (НР+) и группу сравнения – 28 (НР-). НР(+) больным была проведена 7-дневная эрадикационная терапия (омепразол – 20 мг 2 раза в сутки, кларитромицин – 500 мг 2 раза в сутки и амоксициллин – 1000 мг 2 раза в сутки). Контроль эрадикации и пролиферативной активности методом ПЦ осуществляли спустя 4 недели после окончания терапии. После ФГДС пациентов разделили на 4 эндоскопические группы: I – 12 (9,6%) лиц с визуально неизменной слизистой оболочкой желудка, из них 4 пациента НР(+) и 8 НР(-), II – 52 (41,6%) с

Таблица 3

Показатели пролиферативной активности у пациентов с различными морфологическими типами гастритов (M±m)

Показатели	Отдел желудка	Хронический поверхностный гастрит		Хронический атрофический гастрит	
		НР (+)	контрольная группа	НР (+)	контрольная группа
		1	2	3	4
S-фракция, %	Антральный	12,5 ± 1,03	10,4 ± 0,43	6,3 ± 1,92	3,8 ± 0,36
	Тело	11,8 ± 0,52	9,7 ± 0,89	5,6 ± 0,53	3,1 ± 0,57
G2-M-фракция, %	Антральный	3,6 ± 0,78	2,0 ± 1,18	4,1 ± 1,16	2,1 ± 1,03
	Тело	1,5 ± 0,62	1,3 ± 0,53	1,8 ± 1,13	1,2 ± 0,51
Индекс пролиферации (S+G2-M%)	Антральный	16,1 ± 1,31	12,4 ± 1,61	10,3 ± 4,08	5,9 ± 1,39
	Тело	13,3 ± 1,14	11,0 ± 1,42	7,4 ± 1,66	4,3 ± 1,08

$p_{1,2} < 0,05$; $p_{1,3} < 0,05$; $p_{3,4} < 0,05$.

Таблица 4

Показатели пролиферативной активности у пациентов с ЯБЖ (M±m)

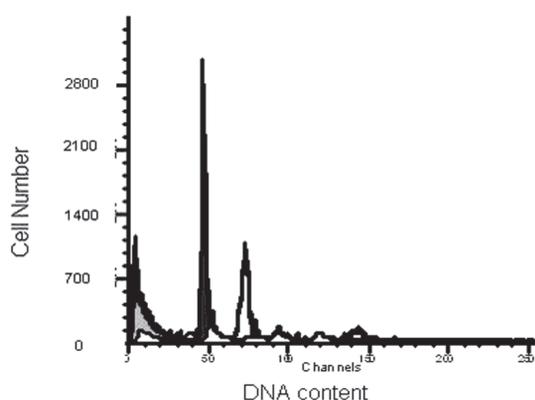
Эндоскопическое заключение	Впервые выявленные язвы		Хронические язвы		Контрольная группа	
	край язвы	3 см от края язвы	край язвы	3 см от края язвы	край язвы	3 см от края язвы
S-фракция, %	14,8±2,8	9,3±3,7	11,3±1,62	8,3±2,8	6,7±1,93	4,6±1,43
G2-M фракция, %	4,9±0,65	2,6±1,37	3,3±1,8	1,8±0,89	2,2±1,28	2,0±1,32
Индекс пролиферации (S+G2-M%)	19,7±3,45	11,9±4,44	14,6±3,42	10,1±3,69	8,9±3,21	6,5±2,75

признаками гастрита, из них 42 НР (+) и 10 НР(-), III – 40 (32%) с ЯБЖ, из них 35 НР(+) и 5 НР(-), IV – 21 (16,8%) с предполагаемым РЖ, из них 16 НР (+) и 5 НР (-).

Среди 97 НР (+) пациентов по результатам гистологического исследования нормальная слизистая выявлена у одного, признаки поверхностного гастрита – у 60, атрофического гастрита – у 11, тонкокишечной метаплазии – у 6, толстокишечной метаплазии – у 6, дисплазии – у 18, рака – у 19 (табл. 1), среди 28 НР (-) – соответственно у 7, 9, 11, 3, 4, 6 и 6 (табл. 2). Из табл. 1 и 2 видно, что у пациентов с предполагаемым эндоскопически РЖ имело место полное совпадение эндоскопического диагноза с гистологическим заключением. Расхождение при использовании этих двух методов было обнаружено у 4 пациентов с эндоскопическим диагнозом ЯБЖ (из них у 3 – с хронической язвой желудка и у одного – с впервые выявленной язвой желудка). В этих случаях гистологически была верифицирована аденокарцинома, т.е. первично-язвенная форма рака. По результатам ПЦ в каждой эндоскопической группе обнаружены лица с повышенной и пониженной пролиферативной активностью эпителиальных клеток слизистой (табл. 3–4).

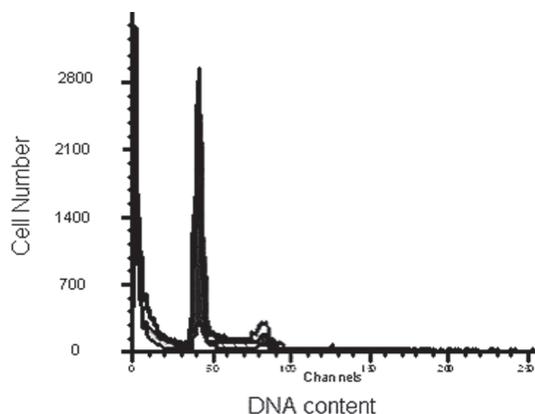
Из табл. 3 видно, что пролиферативная активность выше ($p < 0,05$) в группе пациентов с поверхностным гастритом по сравнению с атрофическим. Это свидетельствует о нормальной реакции макроорганизма на воспаление и отражает адекватную регенерирующую способность эпителия. Кроме того, отмечались прямая корреляция ($r = +0,76$) между пролиферативной активностью и показателем обсемененности НР при поверхностном гастрите и обратная ($r = -0,48$) – при атрофическом гастрите.

Результаты, отражавшие регенерирующую способность эпителия, у лиц с впервые выявленными и с хроническими язвами приведены в табл. 4. Видно, что повышенная пролиферативная активность клеток слизистой края язвы (S-фракция, индекс пролиферации) имела место у пациентов с впервые выявленными язвами по сравнению с больными, имеющими хронические язвы. У пациентов с повышенной пролиферативной активностью края язвы прогноз в плане эпителизации язвенного дефекта лучше, чем у лиц с пониженной пролиферативной активностью [10]. Помимо этого, отмечалась прямая корреляция ($r = +0,42$) между пролифератив-



DIPLOID: 58.38 %
 Dip G0-G1: 94.46 % at 46.72
 Dip G2-M: 0.00 % at 93.43
 Dip S: 5.54 % G2/G1: 2.00
 Dip %CV: 2.91
 ANEUPLOID 1: 41.62 %
 An1 G0-G1: 76.90 % at 72.58
 An1 G2-M: 18.38 % at 142.86
 An1 S: 4.72 % G2/G1: 1.97
 An1 %CV: 3.27
 An1 DI: 1.55
 Total S-Phase: 5.20 %
 Diploid B.A.D.: 19.28 %
 Aneuploid B.A.D.: 41.60 %

Рис. 1. Больная Г., 77 лет. Эндоскопически: плоская язва диаметром 0,5 см по задней стенке желудка. Гистологически: аденокарцинома низкой степени дифференцировки. Проточная цитометрия: анеуплоидия – 41,62%.



DIPLOID: 100.00 %
 Dip G0-G1: 69.17 % at 41.19
 Dip G2-M: 9.67 % at 82.39
 Dip S: 21.16 % G2/G1: 2.00
 Dip %CV: 5.04
 Total S-Phase: 21.16 %
 Diploid B.A.D.: 17.17 %

Рис. 2. Больной Г., 67 лет. Эндоскопически: язва диаметром 0,8 см по задней стенке желудка. Гистологически: аденокарцинома в пределах слизистой. Проточная цитометрия: диплоидная популяция клеток с повышенной S-фракцией.

ной активностью и показателями обсемененности НР. Из общего числа обследованных с ЯБЖ у 4 пациентов были выявлены признаки злокачественной неоплазии: у 3 с хроническими язвами и у одного с впервые выявленной язвой (рис. 1, 2).

Всего из 125 обследованных признаки злокачественной неоплазии были обнаружены у 25 больных, что совпадало с результатами гистологического метода. Среди пациентов с верифицированным раком желудка, опухоли, содержащие диплоидные популяции клеток, наблюдались в 15 случаях (индекс ДНК – менее 1,0), тетраплоидные – в 3 (индекс ДНК – от 1,85 до 2,15), анеуплоидные – в 7 (индекс ДНК – от 1,1 до 1,84). Характерно, что случаи анеуплоидии были зарегистрированы для прогностически неблагоприятных вариантов аденокарциномы. Известно, что пациенты с анеуплоидными опухолями, содержащими несколько анеуплоидных популяций, или с опухолевой фракцией больше 10% имеют выживаемость на 3 года меньше, чем больные с диплоидными опухолями или с опухолевой фракцией меньше 10% [11]. В случаях опухолей, содержащих диплоидные популяции клеток, важным ориентиром верификации злокачественной неоплазии служит показатель S-фракции, имеющий самостоятельное диагностическое значение.

Из 125 обследованных 97 больным была назначена эрадикационная терапия с оценкой пролиферативной активности (табл.5). Последовавшее снижение пролиферативной активности в группе больных с впервые выявленными язвами ($p < 0,05$) и у лиц с поверхностным гастритом было обусловлено эффективностью проведенной эрадикации и адекватным процессом регенерации слизистой оболочки желудка. В случаях с хроническими язвами и атрофическим гастритом достоверного сниже-

Таблица 5

Показатели пролиферативной активности у НР(+) пациентов до и после эрадикационной терапии (M±m)

Показатели	Впервые выявленная язва	Хроническая язва	Хронический поверхностный гастрит	Атрофический гастрит
S-фракция, %	14,8 ± 2,80	11,3 ± 1,62	12,5 ± 1,03	6,3 ± 1,92
G2-M фракция, %	10,8 ± 1,30	10,9 ± 1,38	9,8 ± 1,32	6,0 ± 1,08
	4,9 ± 0,65	3,3 ± 1,8	3,6 ± 0,78	4,1 ± 1,16
	1,2 ± 0,71	2,9 ± 0,93	1,6 ± 0,53	3,8 ± 1,23
Индекс пролиферации (S+G2-M%)	19,7 ± 3,45*	14,6 ± 3,42	16,1 ± 1,31*	10,3 ± 4,08
	12,0 ± 2,01*	13,8 ± 2,31	11,4 ± 1,85*	9,8 ± 2,31

Примечание. В числителе – показатели до эрадикационной терапии, в знаменателе – после этого. * p < 0,05 – различия в сравнении между ними.

ния пролиферативной активности не наблюдалось, что объясняется, по данным литературы, нарушением процессов эпителизации и преобладанием апоптоза [1–3, 7,]. Таких больных относят к группе высокого риска по развитию предраковых и раковых процессов и динамически их контролируют [8, 13].

ВЫВОДЫ

1. Показатель плоидности (индекс ДНК) более 1,0 является самостоятельным маркером злокачественной неоплазии слизистой оболочки желудка.

2. Успешная эрадикация у пациентов с поверхностным гастритом и острой язвенной болезнью желудка после элиминации *Helicobacter pylori* снижает пролиферативную активность клеток слизистой оболочки желудка.

3. У пациентов с хроническими язвами и атрофическими изменениями в слизистой оболочке желудка при сроке одного месяца после успешной эрадикации достоверного снижения пролиферативной активности не наблюдается.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абдулхаков Р.А., Салихов И.Г., Киясов А.П. и др. // Экспер. и клин. гастроэнтерол. – 2004. – № 1. – С.141.
2. Аруин Л.И. // Педиатрия. – 2002. – Т.2 (приложение). – С.27–33.
3. Аруин Л.И., Капуллер Л.Л., Исаков В.А. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника. – М., 1998.
4. Григорьев П.Я., Яковенко Э.П. // Росс. гастроэнтеролог. журн. – 1999. – № 4. – С. 38–42.
5. Иваикин В.Т. Профилактика и лечение хронических заболеваний верхних отделов желудочно-кишечного тракта. – М. 2002.
6. Исаков В.А., Домарадский И.В. Хеликобактериоз. – М., 2003.

7. Исаева Г.Ш., Поздеев О.К. // Казанский мед. ж. – 2003. – № 6. – С.437–443.
8. Поздеев О.К., Фартидинова М.В., Лапушина Г.Н. и др. // Казанский мед.ж. – 2001. – № 2. – С.98–101.
9. Anti. M., Armuzzi A., Iaconell E. // Ital. J. Gastroenterol. Hepatol.–1998.– Vol. 30.– P. 153–159.
10. Domek M.J., Netzer P., Prins B. // Helicobacter. – 2001. – Vol. 6. – P.110–115.
11. Graham D.Y. // Gastroenterology. – 1997. – Vol.113. – P. 1983–1991.
12. Kobayashi I. // J. Gastroenterol. Hepatol. – 1998. – Vol.13 (4). – P.376–382.
13. Ohyama S. // Cancer. – 1990. – Vol.65. – P.116–121.
14. Ormerod M.G. // Analyt. Cell. Patholog. – 1998. – Vol. 17. – P.103–110.
15. Zhang L.X. // Zhonghua Nei Ke Za Zhi. – 2003. – Vol.42 (2). – P.87–97.

Поступила 14.11.06

INTERRELATIONSHIP BETWEEN PROLIFERATIVE ACTIVITIES OF STOMACH MUCOUS CELLS AND HELICOBACTER PYLORI IN PATIENTS WITH CHRONIC DISEASES OF THE STOMACH

R.G.Saifutdinov, Z.M.Galeeva, T.A.Velighinskaya, P.A.Maximov

S u m m a r y

Interrelation of proliferative activity of stomach mucosa cells and H. Pylori presence was studied in 125 patients with chronic stomach diseases. In case of superficial gastritis, newly diagnosed acute and chronic peptic ulcers there were positive correlation between proliferative activity of stomach mucosa cells and degree of H. Pylori dissemination; in case of atrophic gastritis the correlation was negative. The proliferative activity of stomach mucosa cells was increased in case of chronic H.Pylori-associated diseases, but was reduced after successful eradication therapy. However in patients with chronic ulcer and atrophic disorders there were no such changes 1 month after the treatment. Patients with negative dynamics of proliferative activity and absence of adequate regeneration of stomach mucosa cells after eradication need monitoring for 6 months.