

<https://doi.org/10.29296/25877305-2020-05-11>

Показатели пролиферации и апоптоза эпителиальных клеток слизистой оболочки желудка у коренных жителей Республики Тыва с *Helicobacter pylori*-позитивной язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки

В.В. Цуканов, доктор медицинских наук, профессор,
О.В. Перетятыко, кандидат медицинских наук,
А.С. Пуликов, доктор медицинских наук, профессор,
А.В. Васютин, кандидат медицинских наук,
Ю.Л. Тонких, кандидат медицинских наук,
Т.В. Поливанова, доктор медицинских наук,
В.А. Вшивков, кандидат медицинских наук
Федеральный исследовательский центр
«Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН»,
обособленное подразделение «Научно-исследовательский
институт медицинских проблем Севера», Красноярск
E-mail: gastro@imprn.ru

Цель. Изучить показатели пролиферации и апоптоза эпителиальных клеток слизистой оболочки желудка у коренных жителей Республики Тыва с *Helicobacter pylori* (Hр)-позитивной язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки.

Методы. В Республике Тыва во время клинико-эпидемиологического исследования иммуногистохимическое исследование эпителиоцитов слизистой оболочки желудка с определением маркеров пролиферации (Ki-67 и PCNA) и апоптоза (bcl-2 и p53) было выполнено 32 тувинцам (15 мужчин и 17 женщин, средний возраст 47,7 года) с Hр-позитивной язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки (ЯБДПК) и 24 Hр-позитивным тувинцам (12 мужчин и 12 женщин, средний возраст 46,4 года) без язвенной болезни.

Результаты. Индексы апоптоза (bcl-2 и p53) не имели существенных отличий при сравнении больных ЯБДПК и контрольной группы. Маркеры пролиферации эпителиоцитов (Ki-67 и PCNA) и регуляторные коэффициенты (показатели пролиферации / показатели апоптоза) были значительно более высокими у пациентов с ЯБДПК в сравнении с лицами без язвенной болезни.

Заключение. Среди коренных жителей Республики Тыва наблюдается сдвиг пролиферативно-апоптотических взаимоотношений эпителиоцитов желудка в сторону увеличения активности пролиферации у пациентов с Hр-ассоциированной ЯБДПК в сравнении с лицами без язвенной болезни, имеющими инфекцию Hр.

Ключевые слова: гастроэнтерология, апоптоз, пролиферация, язвенная болезнь, *Helicobacter pylori*.

Для цитирования: Цуканов В.В., Перетятыко О.В., Пуликов А.С. и др. Показатели пролиферации и апоптоза эпителиальных клеток слизистой оболочки желудка у коренных жителей Республики Тыва с *Helicobacter pylori*-позитивной язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки. Врач. 2020; 31 (5): 52–55. <https://doi.org/10.29296/25877305-2020-05-11>

Изучению различных аспектов заболеваний желудка и двенадцатиперстной кишки (ДПК) в последние годы уделяется большое внимание [1, 2]. Не вызывает сомнений патогенная роль *Helicobacter pylori* (*Hp*) [3] и других бактерий [4] в развитии гастрита и язвенной болезни [5]. Однако до сих пор конкретные механизмы ульцерогенеза полностью не исследованы [6]. Можно предполагать, что изучение клеточного обновления в слизистой оболочке желудка создаст новые перспективы для понимания патогенеза *Hp*-ассоциированных заболеваний [7, 8].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для определения показателей пролиферации и апоптоза эпителиоцитов желудка у взрослых пациентов в п. Сарыг-Сеп Каа-Хемского района Республики Тыва была проведена фиброэзофагогастродуоденоскопия (ФЭГДС) с забором биопсий из антрального отдела и тела желудка у 56 тувинцев. Среди обследованных лиц 32 человека имели *Hp*-позитивную язвенную болезнь двенадцатиперстной кишки (ЯБДПК), которые составили основную группу (15 мужчин и 17 женщин, средний возраст – 47,7 года). 24 *Hp*-позитивных лиц без язвенной болезни сформировали контрольную группу (12 мужчин и 12 женщин, средний возраст – 46,4 года).

Hp определяли всем 56 пациентам двумя методами: морфологическим (в биоптатах из антрального отдела желудка после окраски по Гимзе и световой микроскопии) и уреазным (в биоптатах из антрального отдела желудка при помощи реактива, приготовленного по прописи: мочевины – 2 г, фенол-рот – 0,5% – 10 мл, азид Na – 20 мг в 100 мл 0,01 М фосфатного буфера pH=5,5).

Определение маркеров пролиферации и апоптоза осуществлялось иммуногистохимическим методом. Забор биоптатов производился в 10% забуференный формалин по Лилли. Обработка биоматериала выполнялась по стандартным гистологическим методикам с заливкой в парафин. Парафиновые срезы толщиной 5–7 мкм были посажены методом флотации на предметные стекла, обработанные полизином (Thermo Scientific). Демаскировка антигенов производилась при температуре 95°C в течение 20 мин в термостатируемой водяной бане WB-4MS (BioSan, Латвия) с трис-ЭДТА (трис + этилендиаминтетрауксусная кислота) буфером pH 9,0 (Dako, Дания) после депарафинизации в ксилоле с последующей обработкой 3% перекисью водорода. Далее на срезы наносились разведенные антитела маркеров пролиферации – Ki-67 (Clone: MIB-1, 1:25) и PCNA (Clone: PC10, 1:200); и апоптоза – bcl-2 (Clone: 124, 1:50) и p53 (Clone: DO-7, 1:25) производства фирмы Dako, Дания. Срезы выдерживались 30 мин во влажной камере при комнатной температуре. Стекла отмывались в нескольких растворах промывочного буфера (Dako, Дания). Далее на срезы наносилась система визуализации EnVision Detection Systems Peroxidase/DAB (Dako, Дания) в соответствии с протоколом производи-

теля. Докраска гистологических структур осуществлялась с использованием гематоксилина с последующим закрытием гистологических препаратов монтирующей жидкостью. Препараты оценивались с помощью микроскопа Olympus CX 41 (Япония) с системой визуализации «БВО-3». Основным рабочим увеличением являлось $\times 400$. Индекс апоптоза измерялся в процентах с использованием стереометрической сетки Г.Г. Автандилова, вмонтированной в окуляр микроскопа в 10 случайных полях зрения в препарате для каждого пациента и был равен доле клеток и ядер с признаками апоптоза от общего количества клеток. Планиметрическое обведение тестировалось по объект-микрометру.

В соответствии со ст. 24 Конституции РФ и Хельсинкской Декларацией о проведении научных исследований все обследованные были ознакомлены с целями, методами и возможными осложнениями в ходе исследований и подписали информированное согласие на участие в обследованиях.

Статистический анализ данных производился с использованием программной версии MS Excel 2000 и Statistica for Windows, версия 6.0 (StatSoft Inc., США). Результаты исследования показателей, выражающих количественные характеристики, представлены медианой (Me) и интерквартильным интервалом (C_{25} – C_{75}). Достоверность различий количественных признаков анализировалась с помощью критерия Манна–Уитни при межгрупповом анализе и критерия Уилкоксона при анализе показателей в рамках одной исследуемой группы. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Процессы пролиферации регулируют циклины, к которым относятся маркеры Ki-67 и PCNA. Ki-67 – ядерный белок, присутствующий в пролиферирующих клетках на разных фазах клеточного цикла и отсутствующий в покоящихся клетках. Его максимум определяется в середине клеточного цикла и на этапе митоза [9]. PCNA – пролиферирующий клеточный ядерный антиген, является кофактором дельта ДНК-полимеразы и участвует в репликации ДНК. Синтез PCNA достигает пиковых значений в S-фазе клеточного цикла и не обнаруживается в покоящихся клетках. Синтетическая фаза клеточного цикла является необратимой, вследствие чего по количеству клеток, вступивших в эту фазу, можно говорить о том, сколько клеток в будущем вступит в фазу митоза [10].

Апоптоз – запрограммированная гибель клеток, которая регулирует численность клеток. В регуляции апоптоза принимает участие большое количество факторов. Белок p53 (проапоптотический) – это транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл. Он активируется при повреждениях генетического аппарата, а также при стимулах, которые могут привести к подобным повреждениям, или являются сигналом

о неблагоприятном состоянии клетки (стрессовом состоянии). Белок p53 задерживает клеточный цикл в фазе G1/S и G2/M, что позволяет запустить репарацию ДНК и (или) пустить клетки по пути апоптоза. Поэтому активация данного белка во многом обуславливает апоптотические процессы [11]. Белок bcl-2 (антиапоптотический) подавляет апоптоз во многих клеточных системах, контролируя проницаемость митохондриальной мембраны и ингибируя каспазы. Экспрессия гена *bcl-2* предохраняет стволовые клетки от апоптоза, вызванного дефицитом факторов роста в любой из фаз клеточного цикла, что приводит к нарушению процесса физиологической регенерации [12].

Индексы апоптоза (*bcl-2* и p53) не имели существенных отличий при сравнении больных ЯБДПК и здоровых лиц (табл. 1). Показатели, характеризующие пролиферацию эпителиоцитов (Ki-67 и PCNA), были значительно более высокими у пациентов с ЯБДПК в сравнении со здоровыми лицами (см. табл. 1). Получен-

ные данные говорят о том, что при язвенной болезни активизируются пролиферативные процессы.

В итоге регуляторные коэффициенты (показатели пролиферации / показатели апоптоза) были значительно более высокими у больных ЯБДПК в сравнении со здоровыми лицами. Соотношение *bcl2/p53* у пациентов с ЯБДПК и контрольных лиц не имело достоверных отличий (табл. 2). Полученная информация позволяет считать, что в изученной популяции коренных жителей Республики Тыва при ЯБДПК происходит сдвиг пролиферативно-апоптотических взаимоотношений в сторону увеличения активности пролиферации.

Известно, что нарушение клеточного обновления является основным механизмом структурных изменений в слизистой оболочке желудка. У многоклеточных организмов гомеостаз поддерживается балансом между пролиферацией и апоптозом. Сдвиг этого баланса в сторону апоптоза увеличивает вероятность атрофии и повреждения тканей, активация пролиферации увеличивает

вероятность развития неопластических процессов [13]. Ранее японские авторы К. Kohda и соавт. продемонстрировали увеличение показателей апоптоза у пациентов с ЯБДПК в сравнении со здоровыми лицами [14]. В нашей работе, выполненной в Хакасии, мы обнаружили аналогичные результаты, заключающиеся в значительном возрастании апоптоза у лиц с ЯБДПК. Показатели пролиферации были недостоверно более высокими у пациентов с ЯБДПК в сравнении с лицами без язвенных дефектов в обеих популяциях [15].

Существует дискуссия по поводу направления клеточного обновления при *Hp*-ассоциированных заболеваниях. Например, S. Moss и соавт. показали, что *SagA* штаммы *Hp* стимулируют апоптоз эпителиоцитов в слизистой оболочке желудка [16]. Но R. Peek и соавт., выполнившие работу в той же лаборатории, сообщили, что *SagA* штаммы *Hp* увеличивают пролиферацию и угнетают апоптоз эпителиоцитов в слизистой оболочке же-

Индексы апоптоза эпителиоцитов желудка у пациентов с ЯБДПК в сравнении с лицами без эрозий и язв

Таблица 1

Indices of gastric epithelial cell apoptosis in patients with DU compared to those without erosions and ulcers

Table 1

Пациенты	Отдел желудка	Индексы апоптоза, %, Me (C ₂₅ -C ₇₅)			
		p53	bcl2	Ki67	PCNA
Пациенты с ЯБДПК	Анtrum (n=32)	2,3 (2,1-2,8)	2,8 (2,7-3,1)	6,2 (4,0-7,8)	8,3 (7,8-9,9)
	Тело (n=32)	2,2 (2,0-2,4)	2,5 (2,2-2,6)	5,9 (5,0-7,5)	8,5 (8,0-10,4)
Лица без язвенной болезни	Анtrum (n=24)	2,6 (2,1-3,0)	3,2 (2,9-4,0)	5,0 (3,7-6,1)	6,0 (5,1-7,4)
	Тело (n=24)	2,2 (1,8-2,8)	2,9 (2,7-3,2)	4,1(3,4-5,2)	7,0 (5,6-7,6)
p ₁₋₃		0,4	0,16	0,04	0,01
p ₂₋₄		0,8	0,13	0,01	0,02

Примечание. Здесь и в табл. 2: достоверность различий показателей вычислена при помощи критериев Манна-Уитни и Уилкоксона.

Пролиферативно-апоптотические взаимоотношения в слизистой оболочке желудка у пациентов с ЯБДПК в сравнении с лицами без эрозий и язв

Таблица 2

Gastric epithelial cell proliferative-apoptotic relationships in patients with DU compared to those without erosions and ulcers

Table 2

Пациенты	Отдел желудка	Индексы апоптоза, Me (C ₂₅ -C ₇₅)				
		bcl2/p53	Ki67/p53	Ki67/bcl2	PCNA/p53	PCNA/bcl2
Пациенты с ЯБДПК	Анtrum (n=32)	1,2 (1,1-1,5)	2,7 (1,9-3,4)	2,2 (1,0-2,9)	3,8 (3,0-4,3)	3,1 (2,5-3,5)
	Тело (n=32)	1,1 (1,1-1,4)	3,3 (2,5-3,4)	2,3 (2,3-3,0)	3,9 (3,6-4,7)	3,3 (3,2-4,7)
Лица без язвенной болезни	Анtrum (n=24)	1,3 (1,1-1,6)	2,1 (1,1-2,7)	1,3 (1,0-1,9)	2,5 (1,7-3,0)	1,9 (1,5-2,1)
	Тело (n=24)	1,4 (1,0-1,6)	2,3 (1,4-2,4)	1,5 (1,3-1,9)	3,0 (2,6-4,1)	2,4 (2,0-2,7)
p ₁₋₃		0,7	0,03	0,004	0,002	<0,001
p ₂₋₄		0,1	0,01	0,02	0,03	0,006

лудка [17]. При сопоставлении данных S. Moss и соавт. и R. Peek и соавт. обращает внимание, что они исследовали представителей разных этнических групп, что, вероятно, имеет решающее значение. В наших предыдущих работах, выполненных на различных сибирских популяциях монголоидов, мы продемонстрировали выраженные колебания распространенности язвенной болезни и заболеваемости раком желудка у эвенков, хакасов и тувинцев, что предполагает определенную дифференциацию патогенеза заболеваний в зависимости от этнической принадлежности [18, 19].

Обследование коренных жителей Республики Тыва позволило сделать вывод о сдвиге пролиферативно-апоптотических взаимоотношений эпителиоцитов желудка в сторону увеличения активности пролиферации у пациентов с *Hp*-ассоциированной ЯБДПК в сравнении с лицами без язвенной болезни, имеющими инфекцию *Hp*.

* * *

Авторы не имеют финансовых и иных конфликтных интересов.

Литература/Reference

- McMahon B.J., Bruce M.G., Koch A. et al. The diagnosis and treatment of *Helicobacter pylori* infection in Arctic regions with a high prevalence of infection: Expert Commentary. *Epidemiol. Infect.* 2016; 144 (2): 225–33. DOI: 10.1017/S0950268815001181
- Штыгашева О.В., Цуканов В.В. Ассоциация *Cag A* и *Vac A* штаммов *Helicobacter pylori* и язвенной болезни в организованной популяции г. Абакана. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.* 2004; 14 (2): 84–7 [Shtygasheva O.V., Tsukanov V.V. Assotsiatsiya *Cag A* i *Vac A* shtammmov *Helicobacter pylori* i yazvennoy bolezni v organizovannoy populyatsii g. Abakana. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii.* 2004; 14 (2): 84–7 (in Russ.)].
- Цуканов В.В., Баркалов С.В., Тонких Ю.Л. и др. Распространенность *CagA*-штаммов *Helicobacter pylori* и язвенная болезнь у населения Восточной Сибири. *Тер. арх.* 2007; 79 (2): 15–8 [Tsukanov V.V., Barkalov S.V., Tonkikh Yu.L. et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* *CaGa* strains and peptic ulcer in the population of Eastern Siberia. *Ter. Arkh.* 2007; 79 (2): 15–8 (in Russ.)].
- Sung J.J.Y., Coker O.O., Chu E. et al. Gastric microbes associated with gastric inflammation, atrophy and intestinal metaplasia 1 year after *Helicobacter pylori* eradication. *Gut.* 2020; pii: gutjnl-2019-319826. [Epub ahead of print]. DOI: 10.1136/gutjnl-2019-319826
- Rugge M., Genta R.M., Graham D.Y. et al. Chronicles of a cancer foretold: 35 years of gastric cancer risk assessment. *Gut.* – 2016; 65 (5): 721–5. DOI: 10.1136/gutjnl-2015-310846
- Агеева Е.С., Штыгашева О.В., Рязанцева Н.В. и др. Молекулярно-генетические факторы, влияющие на исход инфицирования *Helicobacter pylori* у жителей Республики Хакасия. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.* 2010; 20 (4): 16–21 [Ageyeva E.S., Shtygasheva O.V., Ryazantseva N.V. et al. Molekulyarno-geneticheskiye faktory, vliyayushchiye na iskhod infitsirovaniya *Helicobacter pylori* u zhiteley Respubliki Khakasiya. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii.* 2010; 20 (4): 16–21 (in Russ.)].
- Blagih J., Buck M.D., Vousden K.H. p53, cancer and the immune response. *J. Cell. Sci.* 2020; 133 (5): pii: jcs237453. DOI: 10.1242/jcs.237453
- Burclaff J., Osaki L.H., Liu D. et al. Targeted Apoptosis of Parietal Cells Is Insufficient to Induce Metaplasia in Stomach. *Gastroenterology.* 2017; 152 (4): 762–6. DOI: 10.1053/j.gastro.2016.12.001
- Vanneste D., Takagi M., Imamoto N. et al. The role of Hklp2 in the stabilization and maintenance of spindle bipolarity. *Curr. Biol.* 2009; 19 (20): 1712–7. DOI: 10.1016/j.cub.2009.09.019
- Juriková M., Daníhel L., Polák Š. et al. Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. *Acta Histochem.* 2016; 118 (5): 544–52. DOI: 10.1016/j.acthis.2016.05.002
- Aubrey B.J., Kelly G.L., Janic A. et al. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death Differ.* 2018; 25 (1): 104–13. DOI: 10.1038/cdd.2017.169
- Opferman J.T., Kothari A. Anti-apoptotic BCL-2 family members in development. *Cell Death Differ.* 2018; 25 (1): 37–45. DOI: 10.1038/cdd.2017.170
- Thompson C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* 1995; 267 (5203): 1456–62. DOI: 10.1126/science.7878464
- Kohda K., Tanaka K., Aiba Y. et al. Role of apoptosis induced by *Helicobacter pylori* infection in the development of duodenal ulcer. *Gut.* 1999; 44 (4): 456–62. DOI: 10.1136/gut.44.4.456
- Tsukanov V.V., Shtygasheva O.V., Vasyutin A.V. et al. Parameters of proliferation and apoptosis of epithelial cells in the gastric mucosa in indigenous and non-indigenous residents of Khakassia with *Helicobacter pylori* positive duodenal ulcer disease. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2015; 158 (4): 431–3. DOI: 10.1007/s10517-015-2778-z
- Moss S.F., Sordillo E.M., Abdalla A.M. et al. Increased gastric epithelial cell apoptosis associated with colonization with *cagA* + *Helicobacter pylori* strains. *Cancer Res.* 2001; 61 (4): 1406–11.
- Peek R.M., Moss S.F., Tham K.T. et al. *Helicobacter pylori* *cagA*+ strains and dissociation of gastric epithelial cell proliferation from apoptosis. *J. Natl. Cancer Inst.* 1997; 89 (12): 863–8. DOI: 10.1093/jnci/89.12.863
- Tsukanov V.V., Kasparov E.V., Tonkikh J.L. et al. Peptic Ulcer Disease and *Helicobacter pylori* Infection in Different Siberian Ethnicities. *Helicobacter.* 2017; 22 (1): e12322. DOI: 10.1111/hel.12322
- Tsukanov V.V., Butorin N.N., Maady A.S. et al. *Helicobacter pylori* Infection, Intestinal Metaplasia, and Gastric Cancer Risk in Eastern Siberia. *Helicobacter.* 2011; 16 (2): 107–12. DOI: 10.1111/j.1523-5378.2011.00827.x

THE INDICES OF GASTRIC MUCOSAL EPITHELIAL CELL PROLIFERATION AND APOPTOSIS IN *HELICOBACTER PYLORI*-POSITIVE DUODENAL ULCER IN THE NATIVE INHABITANTS OF THE REPUBLIC OF TUVA

Professor V. Tsukanov, MD; O. Peretyatko, Candidate of Medical Sciences; Professor A. Pulikov, MD; A. Vasyutin, Candidate of Medical Sciences; Yu. Tonkikh, Candidate of Medical Sciences; T. Polivanova, MD; V. Vshivkov, Candidate of Medical Sciences
Research Institute for Medical Problems of the North (Separate Subdivision), Federal Research Center «Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences», Krasnoyarsk

Objective: to study the indices of gastric mucosal epithelial cell proliferation and apoptosis in *Helicobacter pylori*-positive duodenal ulcer (DU) in the native inhabitants of the Republic of Tuva.

Methods. In the Republic of Tuva, during a clinical and epidemiological study, an immunohistochemical study of gastric mucosal epithelial cells was performed to identify the markers of proliferation (Ki-67 and PCNA) and apoptosis (*bcl-2* and *p53*) in 32 Tuvans (15 men and 17 women; mean age, 47.7 years) with *Hp*-positive DU and 24 *Hp*-positive Tuvans (12 men and 12 women; mean age, 46.4 years) without DU.

Results. The apoptotic indices (*bcl-2* and *p53*) did not differ significantly when comparing the patients with DU and the control group. The epithelial cell proliferation markers (Ki-67 and PCNA) and regulatory coefficients (proliferative/apoptotic indices) were significantly higher in the patients with DU than in those without DU.

Conclusion. The indigenous inhabitants of the Republic of Tuva show a shift in the gastric epithelial cell proliferative-apoptotic relationships towards a higher proliferative activity in patients with *Hp*-associated DU than in those without DU who have *Hp* infection.

Key words: gastroenterology, apoptosis, proliferation, peptic ulcer, *Helicobacter pylori*.

For citation: Tsukanov V., Peretyatko O., Pulikov A. et al. The indices of gastric mucosal epithelial cell proliferation and apoptosis in *Helicobacter pylori*-positive duodenal ulcer in the native inhabitants of the Republic of Tuva. *Vrach.* 2020; 31 (5): 52–55. <https://doi.org/10.29296/25877305-2020-05-11>

Об авторах/About the authors: Tsukanov V.V. ORCID: 0000-0002-9980-2294; Vasyutin A.V. ORCID: 0000-0002-6481-3196; Tonkikh Yu.L. ORCID: 0000-0001-7518-1895; Polivanova T.V. ORCID: 0000-0003-3842-9147; Vshivkov V.A. ORCID: 0000-0002-1410-8747