

## ПОКАЗАТЕЛИ АПОПТОЗА И ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ В ЖЕЛУДКЕ У БОЛЬНЫХ С РЕВМАТОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

**М.В.Сибиркина, Х.М.Маруфханов, А.А.Эшмурзаева**

**Ташкентской медицинской академии**

**Аннотация.** Программированная клеточная гибель (ПКГ) является одним из ключевых звеньев патогенеза гастритов и язвенной болезни. В ходе исследования был определен пролиферативно-апоптотический статус эпителиоцитов слизистой оболочки желудка у ревматологических больных в дебюте заболевания и на фоне лечения НПВП в сравнении с язвенной болезнью, который позволяет сделать вывод о снижении репаративных процессов.

**Ключевые слова:** апоптоз; пролиферация; эпителиоциты слизистой оболочки желудка.

Десятки тысяч научных работ посвящены механизмам развития апоптоза. В настоящее время накоплен огромный материал, свидетельствующий о роли процессов пролиферации и программированной гибели клеток в поддержании структурной целостности слизистой оболочки желудка. Структурный гомеостаз (гомеоморфоз) тканей обеспечивается равновесием между новообразованием клеток (митоз) и их гибелью (апоптоз). Апоптоз играет огромную роль в гомеостатическом контроле динамического баланса между пролиферацией клеток и их элиминацией, его запуск и поддержание контролируют соответствующие анти- и проапоптотические факторы, среди которых основная регулирующая роль отводится p53, Bcl-2 и PUMA [3,4]. Преобладание митозов ведёт к гиперплазии, преобладание апоптозов - к атрофии [1].

Известно, что у ревматологических больных часто имеет место гастродуоденальные осложнения [5], которые существенно влияют на течение и результаты лечения ревматологических больных [7]. Возможно, это связано с отрицательным влиянием лекарственных средств, применяемых для лечения этой категории больных. Изучение состояния клеточного обновления в желудке и у

ревматологических больных является важным и с позиции того, что широкий арсенал лекарственных средств, применяемых для лечения (НПВП, ГКС, и др.) ревматологических больных, потенциально опасны в связи с развитием гастродуоденальных побочных эффектов.

**Цель** сравнительный анализ относительного содержания эпителиоцитов, подвергавшихся некрозу, величины митотического и апоптотического индексов в слизистой оболочке желудка у эквивалентного количества больных с ревматологическими болезнями в дебюте заболевания и на фоне лечения НПВП и ЯБ ДПК.

**Материалы и методы.** В работе представлены результаты комплексного скринингового обследования 40 больных с ревматологическими заболеваниями (РЗ), из них 20 пациентов в дебюте заболевания, 20 больных с длительностью анамнеза от 1-го до 10 лет и более. Группой контроля являлись больные с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки (ДПК) в количестве 20 человек. Все три группы больных были сопоставимы по полу, возрасту.

Определение маркеров пролиферации и апоптоза осуществлялось иммуногистохимическим методом. Для определения апоптоза и пролиферации применялись иммуногистохимические методы исследования. С этой целью использован биопсийный материал в количестве 60 образцов взятых из антрального отдела желудка (у 40 пациентов с ревматологическими заболеваниями и 20 у больных с язвенной болезнью двенадцати перстной кишки). Обработка биоматериала выполнялась по стандартным гистологическим методикам с заливкой в парафин.

Для определения уровня экспрессии белка p53 в качестве первичных моноклональных антител (МКАТ) использованы p53 (клон ДО-7) «Dakoratts» (Дания), для оценки активности PCNA применяли МКАТ PCNA (клон PC – 10) «Dakoratts» (Дания). Результаты определения экспрессии белка p53 и PCNA оценивали по проценту положительно реагирующих клеток на 500 проанализированных. Индекс апоптоза (ИА) определялся как число окрашенных телец, деленное на 1000 клеток и умноженное на 100%, а индекс митотический индекс

(МИ) высчитывался как число окрашенных ядер, деленное на 500 клеток и умноженное на 100%.

Полученные данные подвергали статистической обработке на компьютере “Pentium I” с использованием пакета программ “Statgrafics” (США). Достоверность различий (P) рассчитывались с использованием критерия t - Стьюдента. Различия считались значимыми при P <0,05. Исследования проводились в лаборатории генетики РОНЦ МЗ РУз.

**Результаты исследований и их обсуждение.** В настоящей работе нами были изучены гибель и пролиферация клеток слизистой оболочки желудка у ревматологических больных в дебюте заболевания и на фоне лечения НПВП.

Как видно из представленных в таблице 1 данных митотический индекс (МИ) у ревматологических больных составил  $0,6 \pm 0,1\%$ , у больных ЯБ данный показатель был выше в 3,5 раза. Ииндекс апоптоза у больных с ЯБ был также выше, чем у ревматологических больных в 1,6 раза. Следовательно, у ревматологических больных в слизистой оболочке желудка, эпителиоциты в меньшей степени подвергаются апоптозу, чем у больных с ЯБ. Аналогичная картина прослеживается и по отношению к пролиферации. Если учесть тот факт, что в нормальных клетках желудка индекс апоптоза (АИ) составляет около 3% [1], у ревматологических больных гибель эпителиоцитов этим путем выше (в 1,6 раза) чем у здоровых людей, что свидетельствует о стимуляции апоптоза при РБ.

Таблица 1

**Некоторые показатели клеточного обновления в слизистой желудка у ревматологических больных**

Группы больных	Показатели			
	МИ	АИ	Некроз %	Коэффициенты



	(Митотический индекс п=6000в %)	(Апoptотический индекс в п=5000%)	п=3000	АИ/МИ	АИ/некр оз
Язвенная болезнь ДПК (контроль)	2,1± 0,2	8,0± 0,5	2,4± 0,3	3,8	3,3
Ревматологические заболевания	0,6± 0,1	4,9± 0,4	1,6± 0,2	8,2	3,1
*P	<0.05	<0.05	<0.05≤P<0.1		

Примечание: \* P <0,05 по сравнению с контролем.

Изучение соотношения апоптоза и митоза (пролиферации) эпителиоцитов у обследуемых групп больных показывает, что, если значения этого соотношения у ревматологических больных составляет 8,2, то у больных ЯБ составляет 3,8, соответственно. Следовательно, изучаемый коэффициент выше у ревматологических больных в 2,2 раза.

Учитывая, что в физиологических условиях должно сохраняться равновесие между процессом пролиферации и гибелью клеток, то становится очевидным, что в условиях, как ревматологических заболеваний, так и язвенной болезни происходит нарушение этого соотношения, за счет преимущественной активации процессов клеточной гибели. Это, несомненно, может привести к клеточному дефициту слизистой оболочки желудка и чревато опасностью развитием атрофического гастрита [9]. Полученные результаты показывают, что нарушение баланса между обновлением и гибелью эпителиоцитов более выражено у ревматологических больных, чем в условиях ЯБ. Это, видимо, обусловлено тем, что в условиях



повышенной гибели клеток слизистой оболочки желудка путем апоптоза, происходит более выраженная стимуляция пролиферативных процессов, и из герминативной зоны формируются новые, молодые эпителиоциты. Это, возможно при наличии достаточной компенсаторной возможности ростковой зоны слизистой оболочки. А в условиях ревматологических больных из-за потенциального системного поражения соединительнотканых структур желудка может исходно страдать ростковая зона и отсюда сравнительно низка интенсивность пролиферативных процессов.

Известно, что существует два пути клеточной гибели: апоптоз и некроз [8]. Путь гибели «выбираемый» повреждаемой клеткой, зависит от многих факторов, включая тип клетки, ее энергетический статус, характер и степень повреждения, состояние иммунной системы организма и др. [10].

Учитывая, что в условиях изучаемых патологий особенно при язвенном поражении ДПК, имеется ряд повреждающих эпителий слизистой оболочки желудка факторов, приводящих клетки к гибели по типу некроза. Нами отдельно была проанализирована характеристика некробиотических процессов слизистой желудка у обследуемых групп больных.

Как видно из данных, представленных в таблице 1, у ревматологических больных удельный вес клеток, подвергающихся некрозу, составляет  $1,6 \pm 0,2\%$ , а у больных с ЯБ этот показатель выше в 1,5 раза.

Следовательно, в условиях, как ревматологических заболеваний, так и ЯБ в слизистой оболочке желудка клетки погибают и путем некроза, причем это сравнительно выражено у больных ЯБ. Если учесть то, что некроз, в отличие от апоптоза, является только проявлением патологического процесса, то становится понятным, что в условиях ревматологических заболеваний, хотя локус первичной атаки находится «далеко» от слизистой желудка, имеет место повреждение эпителиальной выстилки этого органа.

Интересные результаты были получены при анализе соотношения АИ/некроз, несмотря на наличия отчетливых различий между сравниваемыми группами, как по показателю некроза, так и апоптоза, коэффициент соотношения АИ/некроз был

практически одинаковым в обеих группах больных. Это указывает на то, что независимо от количества клеток подверженных гибели, соотношение обоих путей клеточной гибели остается неизменным. Это полностью соответствует мнению С.Ј Zeiss [380], о существовании, так называемого, «апоптозно-некротического континуума», определяемые перекрестными взаимодействиями между реакциями гибели клеток и сохранения гомеостаза.

Известно, что процесс программированной гибели клеток регулируется комплексно через гуморальные факторы, глюкокортикоиды, цитокины, существует и генная регуляция, осуществляемая через специальные белки -регуляторы [11,12]. Среди специальных белков регуляторов программированной гибели центральную роль играет белок р53 [6]. Этот белок регулирует экспрессию генов участвующих в блокаде клеточного цикла, либо взаимодействует с белками участвующих в программированной гибели клеток.

В связи с этим для оценки подготовленности клеток апоптозу у РБ было изучена экспрессия белка р53 в эпителиоцитах желудка. Результаты этих исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2

### Экспрессия белка р53 в слизистой оболочке желудка у ревматологических больных.

Группы больных	Кол-во образцов	Положительная экспрессия белка р53	
		Кол-во положительных наблюдений	Частота р53 положительных клеток, в % n=500
<b>Ревматологические болезни:</b>			
в дебюте	20	1	14,00+1,55



на фоне НПВП	20	13	61,60+2,2 *
Язвенная болезнь ДПК (контроль)	20	10	16,30+1,65

Примечание: \* P < 0,05 по сравнению с контролем.

Как видно у РБ в дебюте заболевания положительная реакция на белок p53 наблюдается только в одном случае из 20 наблюдений, что составляет 5%. В то же время, в желудке у больных с ЯБ ДПК положительная реакция на белок p53 наблюдается в 50% случаев. У РБ, имеющих определенный «стаж», на фоне проводимой терапии противовоспалительными препаратами этот показатель достигает до 65%. Следовательно, у РБ, имеющий достаточный анамнез и получающих симптоматическую терапию, в слизистой оболочке желудка существенно часто встречаются клетки с положительной реакцией на наличие белка p53.

Изучение уровня экспрессии в эпителиоцитах желудка белка p53 показывает (табл. 2), что у РБ в дебюте заболевания уровень экспрессии этого проапоптотического белка практически сравним с уровнем такового у больных с ЯБ. Однако по мере увеличения продолжительности заболевания и приема противовоспалительных лекарственных средств уровень экспрессии белка p53 повышается в 4,4 раза по сравнению с дебютом заболевания. Следовательно, у РБ в слизистой оболочке желудка имеет место высокий уровень экспрессии проапоптотического белка p53. Даже в условиях «дебюта» заболевания экспрессия этого белка в клетках слизистой оболочки желудка у ревматологических больных сопоставима с ЯБ. По мере удлинения длительности заболевания и приема НПВС увеличивается количество клеток с деградированной ДНК и подготовленных к программированной гибели, так как, именно белок p53 обладает способностью предотвращать фиксацию генетических повреждений и инициировать апоптоз в клетках с дефектами ДНК.

Известно, что, несмотря на сходство некоторых деструктивных процессов при апоптозе и некрозе, принципиальным отличием апоптоза является наличие

генетического контроля и специфических белков-регуляторов апоптотического процесса [8]. Поэтому апоптотическую гибель клеток еще называют программируемой гибелью – предназначенной для поддержания постоянства численности и выбраковку дефектных клеток. Апоптоз в здоровом организме сбалансирован его физиологической регенерацией. В то же время процесс регенерации, как и апоптоз, также запрограммирован и имеет генетический контроль. Одним из маркеров этого контроля является экспрессия белка PCNA.

Нами также было изучена экспрессия белка PCNA в клетках слизистой оболочки желудка больных с РБ. Как видно из таблицы 3, в условиях изучаемой патологии, как в дебюте, так и на фоне лечения НПВС, во всех представленных образцах слизистой желудка отмечается положительная реакция на наличие белка PCNA. Аналогичная картина прослеживается в образцах, полученных от больных с ЯБ ДПК.

Таблица 3

### Экспрессия белка PCNA в слизистой оболочки желудка у ревматологических больных.

Группы больных	Кол-во образцов	Положительная экспрессия белка PCNA	
		Кол-во положительных наблюдений	Частота PCNA положительных клеток, в % n=500
Ревматологические болезни:	20	20	95,20± 0,96*
в дебюте			
на фоне НПВП	20	20	78,5±1,8
Язвенная болезнь ДПК (контроль)	20	20	82,1±1,7

Примечание: \* P <0,05 по сравнению с контролем.

Анализ уровня экспрессии белка PCNA в эпителиоцитах желудка показывает, что, если значения изучаемого показателя, в дебюте ревматологических заболеваний составляет  $95,2 \pm 0,96\%$ , то у больных со «стажем» заболевания, на фоне НПВС терапии снижается на 18 %.

Следовательно, по мере «хронизации» заболевания происходит снижение уровня экспрессии белка PCNA – маркера регенерации или пролиферации в эпителиоцитах желудка, а слизистая оболочка желудка становится менее состоятельной, чем при дебюте заболевания, к клеточному обновлению. О чем свидетельствует увеличение коеффициента АИ/МИ у РБ намного выше, чем единица, т.е. наблюдается дисбаланс между гибелью эпителиоцитов с их регенерацией. Необходимо отметить и то, что если уровень экспрессии белка PCNA в клетках слизистой желудка в дебюте ревматологических заболеваний на 16% выше, чем таковая при язвенной болезни, то у РБ со «стажем» на фоне терапии НПВС, этот показатель практически сопоставим с результатами при язвенной болезни (табл. 3). При этом митотический индекс у РБ, как показывают наши результаты (табл. 1), в 3,5 раза ниже, чем у больных с ЯБ.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что у РБ в слизистой оболочке желудка происходит активация апоптоза эпителиоцитов, которая становится более выраженной на фоне противовоспалительной терапии. В то же время между процессом клеточной гибели и процессом регенерации, в слизистой оболочке желудка нарушен баланс, за счет преобладания апоптоза над митозом. В целом нарушение в процессах клеточного обновления в слизистой оболочке желудка у РБ в дебюте заболевания сопоставимы с таковыми нарушениями, имеющими место у больных с ЯБ. А в условиях ревматологических заболеваний с сравнительно длительным течением (на фоне применения НПВС), нарушения в процессах клеточного обновления в слизистой оболочке желудка становятся более выраженными, чем у больных с ЯБ.

Следовательно, из проведенных морфологических исследований ЖКТ у РБ следует отметить, что в принципе выявленные нарушения, как и клинико-

функциональные признаки, схожи с теми нарушениями, которые имеют место у больных с заболеваниями ЖКТ, в частности ГД зоны. При этом отмечаются лишь количественные отличия в зависимости от длительности течения заболевания. Однако здесь необходимо обратить внимание на генез возникновения этих структурных нарушений. Можно предположить, что у больных с РЗ в дебюте, в отличие от заболеваний ЖКТ, локус первичных поражений находится не в паренхиме (эпителиальной) клетки, а в строме, который угнетается, по мере прогрессирования РЗ, затрагивая ростковую зону, изнуряя пролиферативный ее потенциал, оказывает опосредованное влияние на паренхимальные клетки. Вот, видимо, почему в начальных стадиях развития РЗ со стороны ЖКТ в слизистой прослеживаются изменения преимущественно дистрофического характера, без видимых их деструкций. А по мере удлинения сроков анамнеза эти изменения углубляются, и применяемые ЛС оказывают прямое цитодеструктивное действие на «оголенные» эпителиальные клетки ЖКТ. Следовательно, у РБ с длительным течением паренхима (эпителиальный слой) ЖКТ подвергается «атаке» с двух сторон: со стороны соединительнотканной стромы (продолжающаяся антигенная атака) и снаружи, со стороны полости пищеварительной трубки (агрессивное воздействие ЛС – НПВС). Это подтверждается и проводимыми нами морфологическими исследованиями различных отделов ЖКТ у этой категории больных. Из указанного становится понятным, не только развитие морфологических нарушений, имеющих место в условиях ревматологической патологии и патологии ЖКТ самостоятельного характера, но и вытекает необходимость использования в рамках коррекции вторичных нарушений со стороны ЖКТ у РБ как средств, уменьшающих антигенную атаку на соединительнотканную строму ЖКТ, как и средств, оказывающих цитопротективное действие на эпителиальные клетки этого тракта.

Известно, что важным индикатором, определяющим возможности тканей к восстановлению после их повреждения, являются параметры, характеризующие интенсивность процессов клеточного обновления: степень гибели и пролиферации, а также их соотношение (Б.К.Нургалиева, Г.А.Хамидулина, В.Т.Ивашкин и др., 2005.).

Если процесс гибели клеток преобладает над процессом пролиферации, то наступает клеточный «коллапс» - атрофия, а если, наоборот, то наступает гиперплазия (А.В.Кононов, С.И.Мозговой, М.А.Ливзан и др. 2005.). В оценке процессов клеточной гибели важным является выяснение типа клеточной гибели: апоптоз или некроз. Хотя оба типа клеточной смерти в конечном итоге приводят к уменьшению числа функционирующих клеток, однако, пути гибели, выбираемые клетками, неоднозначны с позиции процессов клеточного обновления, в частности пролиферации. Некроз является результатом незапланированного события и происходит спонтанно, апоптоз формируется как четко-регулируемый, генетически-детерминируемый процесс [2].

Если вопрос клеточного обновления с позиции апоптоза и пролиферации в условиях патологии ГД зоны в настоящее время достаточно изучен, то характер нарушений этих процессов в ЖКТ в условиях ревматологической патологии остается не решенным, особенно касаясь зависимости от длительности течения РЗ и приема ЛС, в частности НПВС.

В связи с изложенным, в настоящей работе нами были изучены показатели клеточного обновления (апоптоз, некроз, пролиферация и др.), а также генетические маркеры (p53, PCNA) этого процесса в желудке у обследуемых больных с РЗ (в дебюте и в условиях длительного течения патологии) в сравнительном аспекте с больными ЯБ.

Результаты проведенных исследований в этом направлении свидетельствуют о том, что у РБ в слизистой оболочке желудка происходит активация апоптоза эпителиоцитов, который становится более выраженным на фоне противовоспалительной терапии (рис.1). Наряду с этим нарушается баланс между процессами клеточной гибели и репарации клеток слизистой оболочки желудка вследствие преобладания процессов апоптоза над митозом.

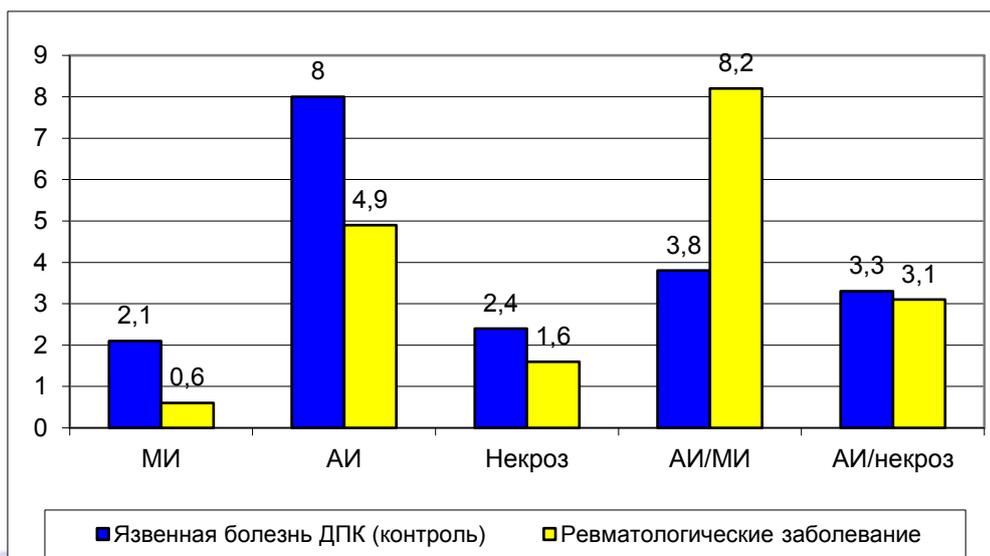


Рис.1. Некоторые показатели клеточного обновления в слизистой желудка у ревматологических больных

В целом нарушения процессов клеточного обновления в слизистой желудка у РБ сопоставимы с ЯБ, о чем свидетельствуют сдвиги в экспрессии генетических маркеров P-53 и PCNA (рис.2,3). При длительном течении РЗ и применении НПВС нарушения процессов клеточного обновления в слизистой желудка становятся более выраженными, чем у больных с ЯБ.

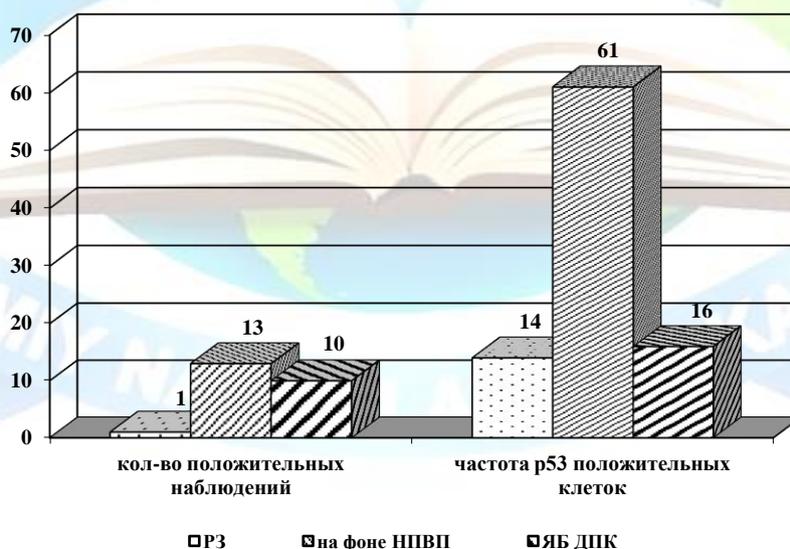


Рис.2. Экспрессия белка p53 в СОЖ у ревматологических больных

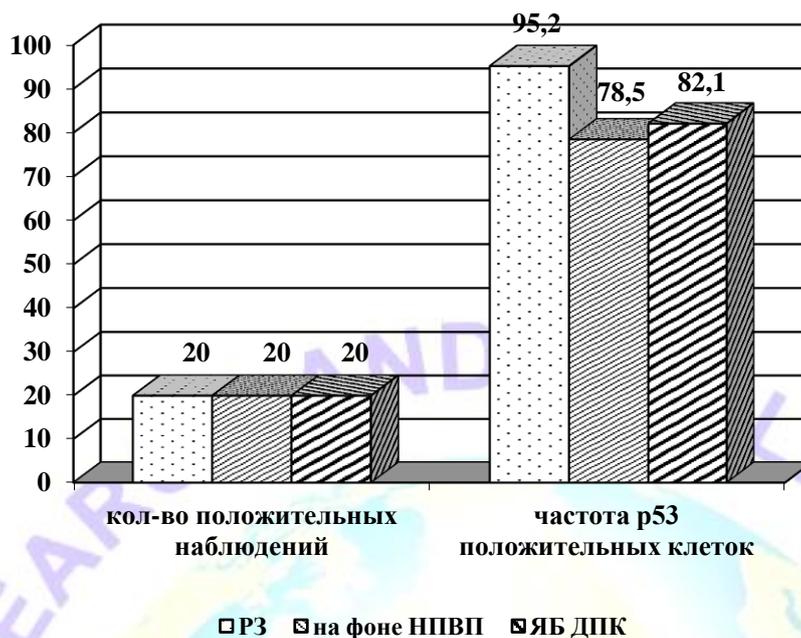


Рис.3. Экспрессия белка PCNA в СОЖ у ревматологических больных

**Заключение.** Таким образом, результаты проведенных исследований позволяют сделать умозаключение о том, что у РБ имеет место поражение со стороны ЖКТ, даже до применения лекарственных препаратов (НПВС), причем со стороны всех отделов ЖКТ. Поражение ЖКТ у РБ подтверждается клинико-функциональными, эндоскопическими, микробиологическими, структурно-биохимическими методами исследования. Степень выраженности проявления поражения ЖКТ у РБ зависит от длительности заболевания. Если в дебюте заболевания клиническая симптоматика преобладает над другими признаками, то с увеличением длительности анамнеза заболевания клинические симптомы, наоборот, уступают другим проявлениям поражения ЖКТ.

У РБ отмечается заметное усиление процессов клеточной гибели, за счет преобладания некротической гибели над апоптотической и резкое снижение пролиферативной активности желудочного эпителия, что подтверждается со стороны генетических маркеров апоптоза и пролиферации. Указанные закономерности менее выражены, чем при язвенном поражении желудка, особенно в дебюте заболевания.

Таким образом, первичное повреждение соединительнотканых структур ЖКТ, с одной стороны, цитодеструктивное действие ЛС, применяемых для лечения РЗ, с

другой, оказывают дестабилизирующее действие на паренхиматозные клетки пищеварительной трубки, создавая условия для возникновения функциональных (в дебюте) и органических изменений в указанной системе. Эти изменения, несомненно, оказывают отрицательное влияние на течение основного заболевания, усугубляя его клинические проявления и снижая эффективность проводимого лечения.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что у РБ имеют место клиничко-биохимические, функциональные, микробиологические нарушения со стороны ЖКТ. Эти изменения прослеживаются не только у больных с определенной длительностью течения РЗ, но и в дебюте заболевания. Кроме того, они не одинаково представлены в зависимости от отделов ЖКТ и продолжительности болезни. Применяемые для лечения ревматологической патологии ЛС, в частности НПВС, способствуют усугублению имеющихся нарушений со стороны пищеварительной трубки.

## Список литературы

1. Аруин Л.И. Клеточное обновление слизистой оболочки желудка в условиях инфекции *Helicobacter pylori*. // Педиатрия. – 2002. – № 2. – С.27-33.
2. Перетяцько О.В., Цуканов В.В., Пуликов А.С. Оценка пролиферативно-апоптотического статуса эпителиоцитов слизистой оболочки желудка у пациентов с атрофическим гастритом. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*, Vol 11, №5, 2019: 118-122.
3. Калиниченко С.Г., Матвеева Н.Ю. Морфологическая характеристика апоптоза и его значение в нейрогенезе. *Морфология*. 2007; 131 (2): 16-28.
4. Матвеева Н.Ю. Апоптоз: морфологические особенности и молекулярные механизмы. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2003; 4: 12-16.
5. Каратеев А.Е., Насонов Е.Л., Яхно Н.Н. и др. Клинические рекомендации «Рациональное применение нестероидных противовоспалительных препаратов

(НПВП) в клинической практике». Современная ревматология - 2015. - № 9 (1). - С. 4-24.

6. Бондаренко О.Ю., Коган Е.А., Склянская О.А. и др. Апоптоз и пролиферация эпителиоцитов при *Helicobacter pylori* – ассоциированном гастрите. // РЖГГК – 2003. – №6, – С.27-32.

7. Ивашкин В.Т., Шептулин А.А., Макрянц М.Л. Ненаркотические анальгетики и поражения желудочно-кишечного тракта: факторы риска, лечение, профилактика. // Клин. Медицина. – 2001 – №3. – С.4-7.

8. Ипатова. О.М. Апоптоз и некроз – два варианта пути гибели поврежденной клеток. Фосфоглив: механизм действия и применения в клинике. – 2005. 117-129 с.

9. Кононов А.В., Мозговой С.И., Ливзан М.А., Предвечная И.К., Морфология поверхностного и атрофического хронического гастрита при эрадикации *Helicobacter pylori*.// Арх. Патология. 2005. № 3. стр.17-21.

10. Green D.R., Overview: apoptotic Signaling pathways in the immune system// Immunol. Rev. – 2003. 193. – 5-9.

11. Sipponen P. Gastric cancer: pathogenesis, risks and prevention. Am. J. Gastroenterol. 2002; 97 (Suppl. 13): 39-44.

12. Sieper J., Braun J. Overview of the anti-TNF agent infliximab in chronic inflammatory disease. //Exp. Opin. Ther.- 2003.- № 3.-P. 141-168