

- schizophrenia and attention deficit hyperactivity disorder. *Neurotoxicity Research*. 2006; 10:167–179. DOI: 10.1007/BF03033354.
9. *Gainetdinov R. R., Caron M. G.* An animal model of attention deficit hyperactivity disorder. *Molecular Medicine Today*. 2000; 6(1): 43–44. DOI: 10.1016/s1357-4310(99)01616-0
10. *Саркисов Д. С., Перов Ю. Л.* Микроскопическая техника. М.: Медицина, 1996. 544 с.

УДК 616-091.8

Деев Р. В., Слепов Ю. К., Ахмедов А. С., Емелин А. М.

ВЛИЯНИЕ КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА ИНФИЛЬТРАТА В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ЖЕЛУДКА НА РЕАКТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ ТКАНИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ АТРОФИЧЕСКОМ ГАСТРИТЕ

*Северо-Западный государственный медицинский университет
им. И. И. Мечникова, Санкт-Петербург, Российская Федерация*

Аннотация. Целью работы является характеристика клеточного состава воспалительного инфильтрата в волокнистой соединительной ткани собственной пластинки слизистой оболочки желудка у пациентов с атрофическим гастритом.

Материал и методы: в исследование включены мультифокальные биоптаты желудка, полученные от 20 пациентов с клиническим и эндоскопическим диагнозом хронический атрофический гастрит. Биоптаты подвергали стандартной гистологической обработке с окраской гематоксилином и эозином, по Маллори и альциановым синим. Для типирования субпопуляций лейкоцитов поставлены иммуногистохимические реакции с антителами к CD68, CD4, CD8, CD20, CD138.

Основные результаты работы показали, что при разделении биоптатов слизистой оболочки антрального отдела и тела желудка на две группы сравнения — с так называемой кишечной метаплазией и без метаплазии, субпопуляционный состав лейкоцитов, определяющий в том числе и местный цитокиновый профиль, являющийся важным эпигенетическим фоном, влияющим на дифференцировку эпителиоцитов, различен. Так статистически значимая разница установлена для числа M1-макрофагов (CD68+, p-value — 0,011) и В-лимфоцитов (CD20+ лимфоцитов, p-value — 0,047). Построенная модель логистической регрессии объясняет 63,7% данных.

Ключевые слова: атрофический гастрит, метаплазия, макрофаг, лимфоцит, цитокин, эпигенетика.

Deev R. V., Slepov I. K., Akhmedov A. S., Emelin A. M.

INFLUENCE OF THE INFILTRATE CELLULAR COMPOSITION IN THE GASTRIC MUCOSA ON REACTIVE CHANGES OF EPITHELIAL TISSUE IN CHRONIC ATROPHIC GASTRITIS

*I. I. Mechnikov North-Western State Medical University of Ministry of Health of Russia,
St. Petersburg, Russian Federation*

Summary. The aim of the work is to characterize the cellular composition of the inflammatory infiltrate in the fibrous connective tissue of the lamina propria of the gastric mucosa in patients with atrophic gastritis.

Material and method. The study included multifocal gastric biopsies obtained from 20 patients with a clinical and endoscopic diagnosis of atrophic gastritis. Biopsies were subjected to standard histological processing with hematoxylin and eosin, Mallory and Alcian blue staining. For typing of leukocyte subpopulations, immunohistochemical reactions were performed with antibodies to CD68, CD4, CD8, CD20, CD138.

The main results of the work showed that biopsy samples of the mucous membrane of the antrum and body of the stomach can be divided into two groups with and without intestinal metaplasia. Subsequent comparison of the subpopulation composition of leukocytes demonstrates differences in these groups. This is important because leukocyte composition influences the local cytokine profile, which is an important epigenetic background influencing epithelial cell differentiation. Thus, a statistically significant difference was established for the number of M1 macrophages (CD68+, p-value — 0,011) and B-lymphocytes (CD20+ lymphocytes, p-value — 0,047). The logistic regression model explains 63,7% of the data.

Keywords: atrophic gastritis, metaplasia, macrophage, lymphocyte, cytokine, epigenetics.

ВВЕДЕНИЕ

Проблема реактивности эпителиальных тканей, в частности, эпителия кишечного типа, является важной главой общей гистологии и частного раздела науки о тканях. Являясь высокореактивными структурами, производные слизистой оболочки желудка (а также кишечника) нередко претерпевают под воздействием повреждающих факторов преобразования, вовлекающие молекулярно-генетические пути дифференцировки. Одним из самых распространенных повреждающих факторов является паразитизм инфекционного агента — *Helicobacter pylori* (HP). Еще в конце 80-х годов прошлого века показано, что длительное его существование в слизистой оболочке желудка приводит к важным гистогенетическим событиям: воспалительно-дистрофическим изменениям, проявляющимся среди прочего упрощением структур желез, их атрофией, дифференцировкой камбиальных клеток желудочного эпителия по пути кишечного варианта с формированием так называемой неполной (только бокаловидные клетки) и полной (с появлением клеток Панета, каемчатых эпителиоцитов и выработкой иной по составу слизи) метаплазии; которые, в свою очередь, являются предвестниками малигнизации и развития рака желудка или карциноидных опухолей [1, 2]. Указанные изменения получили название каскада P. Согреа.

Атрофическая стадия этого процесса нередко диагностируется как НР-ассоциированный атрофический гастрит, характеризующийся морфо-функциональным угнетением желез слизистой оболочки тела и антрального отдела желудка. Морфогенетической основой их атрофии является нарушение процессов гистогенеза эпителиальной ткани органа (пролиферации, дифференцировки, интеграции, выполнения специфических функций, гибели) и стромально-эпителиальных взаимодействий. Воспалительные изменения, в которые при этом вовлечены соединительнотканые структуры стенки желудка, включают миграцию и функционирование различных клеток гемопоэтического дифферона: гранулоцитов, макрофагов, различных субпопуляций лимфоцитов.

Вместе с тем установлено, что альтернативным механизмом атрофических изменений в слизистой оболочке является развитие аутоиммунного поражения эпителиальной ткани желез. В частности, появление аутореактивных клонов плазматических клеток может приводить к блокировке антителами париетальных клеток за счет формирования иммунных комплексов с протонной помпой или внутренним фактором Кастла.

Показано, что атрофические и нарастающие вслед за этим метапластические процессы несут в себе онкогенный потенциал, что создает необходимость своевременного выявления предикторов озлокачествления желудочного эпителия. На сегодняшний день принято выделять атрофический гастрит без признаков дифференцировки в направлении кишечного эпителия (без метаплазии) и с признаками дифференцировки желудочного эпителия в энтеро- и колоноциты (с неполной и полной метаплазией). Причины и механизмы, приводящие к такой пере- или недодифференцировке эпителия, всё еще остаются не расшифрованными. Предложена гипотеза о том, что состав клеточного инфильтрата и создаваемый его клетками цитокиновый профиль в соединительной ткани является значимым эпигенетическим фактором, напрямую влияющим на генетическую регуляцию дифференцировки клеток, в том числе эпителия кишечного типа [3, 4]. Первичной проверке этой гипотезы посвящено настоящее исследование.

Цель работы: охарактеризовать клеточный состав воспалительного инфильтрата в волокнистой соединительной ткани собственной пластинки слизистой оболочки желудка у пациентов с хроническим атрофическим гастритом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования послужили мультифокальные биоптаты слизистой оболочки желудка, взятые согласно рекомендациям из 5 точек [5, 6, 7]. Непосредственному анализу в контексте настоящей работы послужили участки, полученные из антрума и тела органа. Все биоптаты были подвержены стандартной гистологической обработке с получением парафиновых срезов, которые окрашивали гематоксилином и эозином; для выявления слизь-образующих клеток — альциановым синим; для оценки фиброза — по Маллори. Биоптаты характеризовали согласно классификации OLGA в современной редакции [5]. На основании полученных данных относили пациента к группе 1 — атрофический гастрит без метаплазии или к группе 2 — атрофический гастрит с метаплазией.

Последующее иммуногистохимическое исследование предпринято для типирования субпопуляций лейкоцитов в составе инфильтрата, расположенного в собственной соединительнотканной пластинке слизистой оболочки. Оно

включало набор реакций с антителами к CD68 — макрофаги, CD4 — лимфоциты Т-хелперы, CD8 — цитотоксические Т-лимфоциты, CD20 — В-лимфоциты, CD138 — плазмциты. Реакции были произведены после депарафинизации и дегидратации, демаскировки антигенов Трис-ЭДТА буфером (рН = 8,0) в течение 30 минут, блокировки эндогенной пероксидазы 3%-ным раствором перекиси водорода на протяжении 30 минут при 37 °С. Продукт реакции выявляли при помощи гистохимической реакции с выпадением нерастворимого хромогена ди-аминобензидина [8].

Морфометрический учет клеток проводили для биоптатов из антрума и тела желудка после верификации наличия или отсутствия кишечной метаплазии; определяли долю каждого типированного вида клеток в инфильтрате (%), а также в перерасчете на площадь соединительной ткани (на 1 мм²). Определяли медианные значения (так как распределение отличалось от нормального) и межквартильный размах (IQR).

Разницу средних рассчитывали с помощью теста Манна-Уитни. Для определения взаимосвязи между составом иммунного инфильтрата и наличием/отсутствием метаплазии была построена модель логистической регрессии. Статистический анализ проводился в пакете программ RStudio.

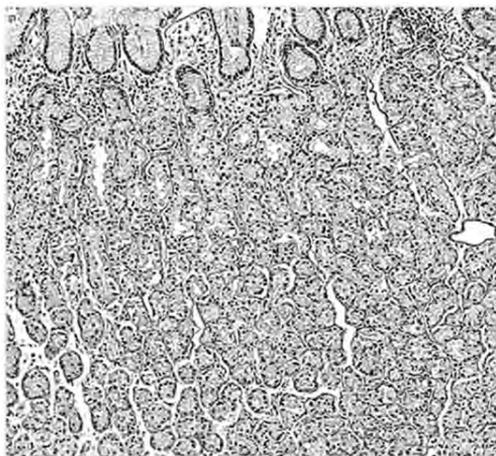
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате работы установлено, что включенные в общую выборку биоптаты (n = 38) были распределены следующим образом: по 9 секунд метаплазией и без нее из слизистой оболочки антрума и по 10 секунд метаплазией и без нее из слизистой оболочки тела желудка. В случаях выявления метаплазии лишь в двух препаратах она была отнесена к полному варианту; изменения в остальных были трактованы как неполная метаплазия, то есть с аберрантной (девиантной) дифференцировкой эпителиоцитов в бокаловидные клетки без признаков образования клеток Панета. Атрофия желез характеризовалась уменьшением их количества, снижением глубины желудочных ямок фундальных желез и их разветвленности. В отдельных биоптатах определялось уменьшение количества париетальных клеток, что может быть свидетельством аутоиммунного генеза гастрита.

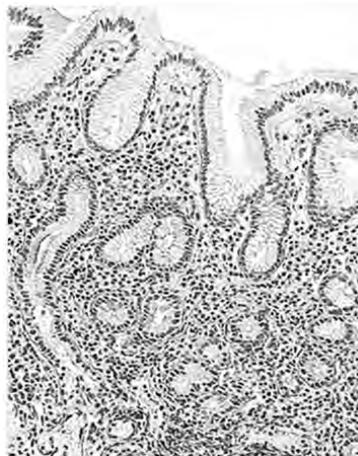
Волокнистая соединительная ткань стромы слизистой оболочки, ее собственная пластинка были инфильтрированы лейкоцитами (рис. 1). Иммуногистохимическое типирование клеток инфильтрата позволило выделить статистически значимые различия в группах с метаплазией и без (табл. 1, 2). Показано, что преобладающую долю в составе клеточного инфильтрата занимают цитотоксические Т-лимфоциты, причем в биоптатах без метаплазии их доля достигает трети, а с метаплазией — 1/5 от всех клеток. М1-макрофаги занимают второе место, и их число в медианном значении может достигать почти 16% в случаях хронического атрофического гастрита без метаплазии и всего 5,6% с метаплазией. Клетки-эффекторы гуморального иммунитета — В-клеточное звено представлено хоть и заметным числом, но меньшей долей, чем Т-лимфоциты.

Вместе с тем при анализе статистической значимости различий (табл. 2) установлено, что две субпопуляции лейкоцитов могут иметь важное значение в развитии кишечной метаплазии или быть реакцией на нее — макрофаги и В-лимфоциты. Наиболее важными и статистически значимыми отрицательными

предикторами развития метаплазии оказались макрофаги CD68+ (p -value = 0,011) и В-лимфоциты CD20+ (p -value = 0,047). Согласно построенной модели логистической регрессии, в которой как независимый количественный предиктор использован состав иммунного инфильтрата, коэффициент детерминации R2 составил 0,637, указывая на то, что модель объясняет 63,7% данных.



а



б



в



г

Рис. 1. Структура слизистой оболочки желудка при хроническом гастрите: а — минимально выраженные изменения в виде умеренной лимфо-гистиоцитарной инфильтрации собственной пластинки; б — гастрит с умеренно выраженной неполной кишечной метаплазией, выраженная инфильтрация соединительной ткани; в, г — гастрит с полной кишечной метаплазией; * — клетки с апикальной зернистостью — клетки Панета; над ними — каемчатые эпителиоциты. Окраска: гематоксилин и эозин. Ув.: а–в $\times 200$, Г $\times 400$

Таблица 1

**ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОЧНОГО ИНФИЛЬТРАТА
ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ АТРОФИЧЕСКОМ ГАСТРИТЕ**

Показатель	Отдел слизистой оболочки	Без метаплазии	С кишечной метаплазией
Количество биоптатов	Анtrum	9	9
	Тело	10	10
CD68+ M1-макрофаги	%	Me = 15,9 IQR = 9,35	Me = 5,6 IQR = 6,54
	кл. на мм ²	Me = 79 IQR = 44	Me = 27 IQR = 31
CD4+ Т-хелперы	%	Me = 10,32 IQR = 6,46	Me = 10,9 IQR = 17,13
	кл. на мм ²	Me = 49 IQR = 37	Me = 54 IQR = 76
CD8+ цитотоксические Т-лимфоциты	%	Me = 34,03 IQR = 21,24	Me = 21,5 IQR = 8,65
	кл. на мм ²	Me = 174 IQR = 136	Me = 111 IQR = 39
CD20+ В-лимфоциты	%	Me = 13,75 IQR = 17,235	Me = 12,1 IQR = 14,83
	кл. на мм ²	Me = 72 IQR = 85	Me = 61 IQR = 72
CD138+ плазмоциты	%	Me = 6,22 IQR = 8,26	Me = 4,95 IQR = 10,7
	кл. на мм ²	Me = 35 IQR = 48	Me = 23 IQR = 52

Таблица 2

**ЗНАЧЕНИЯ РАЗЛИЧИЙ МЕДИАННЫХ ЗНАЧЕНИЙ КЛЕТОК
В СОСТАВЕ ИНФИЛЬТРАТА**

Предиктор	Отношение шансов развития метаплазии	Доверительный интервал	p-value
Intercept (значение без учета иммунного инфильтрата)	0,00	0,00–0,16	0,010
CD68+ макрофаги	0,72	0,55–0,93	0,011
CD4+ Т-хелперы	1,02	0,95–1,10	0,632
CD8+ цитотоксические Т-лимфоциты	0,94	0,85–1,05	0,278
CD20+ В-лимфоциты	0,83	0,68–1,00	0,047
CD138+ плазмоциты	0,93	0,81–1,07	0,300

Примечание. Intercept (значение без учета иммунного инфильтрата) — среднее значение зависимой переменной (отсутствии/наличии метаплазии) без учета иммунного инфильтрата. Жирным шрифтом указаны клетки, различие числа которых в биоптатах с метаплазией и без нее статистически значимы.

Значение иммунного инфильтрата в развитии атрофического гастрита и метаплазии изучено недостаточно. Некоторыми исследованиями показано, что патоморфогенез атрофического гастрита связан или даже непосредственно реализуется через механизм иммунной активации MALT (mucosa-associated lymphoid tissue, лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистой оболочкой), проявляющийся стойким неадекватным ответом иммунных клеток и прежде всего — Т-лимфоцитов. Установлено, что в биоптатах слизистой оболочки может быть идентифицировано увеличение эффекторных Т-клеток, в частности — CD4+ [7, 9, 10]. Не исключено, что дополнительным фактором повреждения слизистой оболочки становится извращение механизмов толерантности Т-клеток. Кроме этого, показано увеличение доли цитотоксических CD8+ лимфоцитов. Помимо опосредованного влияния на состояние тканей слизистой оболочки, в отношении CD4+ Т-лимфоцитов показано воздействие компонентов их транскриптома и протеома на цито- и гистогенез эпителия кишечного типа. Среди таких веществ особо подчеркнута роль фактора некроза опухолей γ (индукция апоптоза эпителиоцитов, IL-13 (индукция девиантной дифференцировки и канцерогенеза), трансформирующий фактор роста β (поддержание пролиферации) [9, 11].

Согласно полученных нами данных, значимую долю в составе инфильтрата в случае уже развившейся кишечной метаплазии составляют CD68+ макрофаги, соответствующие M1-фенотипу (провоспалительный/фагоцитарный) и CD20+ В-лимфоциты.

Следует отметить, что, судя по всему, жесткой принадлежности макрофагов к одному из функциональных фенотипов M1/M2 не существует. Наиболее вероятно, что экспрессия маркерных генов и молекул в данном случае отражает функциональное состояние клетки в конкретный момент времени на этапах гистогенетических или патогистогенетических процессов, отражая или фагоцитарную активность клетки, или приоритетный регуляторный (M2 — противовоспалительный, секреторный) паттерн функционирования. Протеом макрофагов, вовлеченных в патогенез хронического атрофического гастрита, включает значимый спектр провоспалительных цитокинов: фактор некроза опухолей α , IL-1, -6, -18 и др. [12, 13]. Причем имеются данные о значимости M2-функционального типа для нарастания явлений метаплазии и малигнизации. При сопоставлении аутоиммунного гастрита с НР-ассоциированным хроническим атрофическим гастритом установлены различия в количестве M1 макрофагов. В частности, в первом случае их было статистически значимо больше в составе инфильтрата. Возможно этот факт связан с достоверно меньшим риском малигнизации этой группы гастритов, что было показано той же группой авторов.

Лимфоциты CD20 являются относительно немногочисленной популяцией клеток в составе инфильтрата при атрофическом гастрите, и их патогенетическую роль в развитии метаплазии еще предстоит установить [14].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В профессиональной литературе по-прежнему считается, что молекулярный патогенез кишечной метаплазии в слизистой оболочке желудка не вполне понятен. Показано, что среди эпителиоцитов метаплазированной выстилки могут присутствовать как клетки, сохранившие каноническую для данной локализации дифференцировку, так и клетки, развившиеся вследствие девиантной дифференцировки

[15]. Одним из механизмов ее запуска может быть активация транскрипционного фактора Cdx2. Однако это событие не обязательно напрямую связано с хронической инфекцией *H. pylori*; очевидно, что в реализации тканевого патоморфогенеза реактивных преобразований эпителия участвуют и факторы макроорганизма, в частности, особенности активации и цитофизиологии клеток иммунной системы, их функционирования на гистионном уровне организации [16].

Таким образом, на основании гистологического, иммуногистохимического и морфометрического исследования относительно небольшого количества биоптатов слизистой оболочки желудка при хроническом атрофическом гастрите следует принять гипотезу о возможном непосредственном влиянии состава клеточного инфильтрата на пути реализации генетической информации кишечным эпителием в ходе гистофизиологических циклов обновления железистого желудочного эпителия, что, по сути своей, является одним из проявлений реактивности эпителиев. Вместе с тем в дальнейших исследованиях следует осуществить отдельную оценку изученных параметров у пациентов с различной этиологией болезни: НР-ассоциированным и аутоиммунным гастритом, а также принять во внимание различную длительность болезни.

ЛИТЕРАТУРА

1. Correa P., Piazuelo M. B. The gastric precancerous cascade. *J. Dig. Dis.* 2012; 13(1):2–9. DOI: 10.1111/j.1751-2980.2011.00550.x
2. Jonaitis P., Kupcinskas L., Kupcinskas J. Molecular Alterations in Gastric Intestinal Metaplasia. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22:5758. DOI: 10.3390/ijms22115758.
3. Деев Р. В., Слепов Ю. К., Индейкин Ф. А. Метаплазия как эпигенетическая проблема вариантной и девиантной дифференцировки // Труды Военно-медицинской академии. — Т. 263. Инновационные технологии изучения гистогенеза, реактивности и регенерации тканей. — СПб.: ВМедА, 2023.
4. Слепов Ю. К., Курилин И. С. Оценка влияния состава иммунного инфильтрата на развитие кишечной метаплазии слизистой оболочки желудка у больных хроническим атрофическим гастритом // Мечниковские чтения-2023: Материалы 96-й Всероссийской научно-практической конференции студенческого научного общества с международным участием, Санкт-Петербург, 26–27 апреля 2023 г. — С. 456.
5. Dixon M. F., Genta R. M., Yardley J. H., Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am. J. Surg. Pathol.* 1996; 20(10):1161–1181. DOI: 10.1097/00000478-199610000-00001
6. Ивашкин В. Т., Маев И. В., Лапина Т. Л. и др. Клинические рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации и ассоциации «Эндоскопическое общество РЭНДО» по диагностике и лечению гастрита, дуоденита // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. — 2021. — № 31(4). — С. 70–99. — DOI: 10.22416/1382-4376-2021-31-4-70-99
7. Shah S. C., Piazuelo M. B., Kuipers E. J., Li D. AGA Clinical Practice Update on the Diagnosis and Management of Atrophic Gastritis: Expert Review. *Gastroenterol.* 2021; 161:1325–1332. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.06.078>

8. *Мавликеев М. О., Киясов А. П., Деев Р. В.* и др. Гистологическая техника в патологоанатомической лаборатории. — М.: Практическая медицина, 2023. — 112 с.
9. Algood H. M. S. T-Cell Cytokines Impact Epithelial Cell Responses during Helicobacter pylori Infection. *J. Immunol.* 2020; 204(6):1421–1428. DOI: 10.4049/jimmunol.1901307
10. Raza M., Bhatt H. Atrophic Gastritis. Last Update: July 24, 2023. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563275>
11. Noto C. N., Hoft S. G., Bockerstett K. A., et al. IL13 Acts Directly on Gastric Epithelial Cells to Promote Metaplasia Development During Chronic Gastritis. *Cell Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 2022; 13:623–642. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2021.09.012>
12. Jeong S., Choi E., Petersen C.P., et al. Distinct metaplastic and inflammatory phenotypes in autoimmune and adenocarcinoma-associated chronic atrophic gastritis. *United Eur. Gastroenterol. J.* 2017; 5(1):37–44. DOI: 10.1177/2050640616644142
13. *Голубинская Е. П., Сатаева Т. П., Фомочкина И. И.* и др. Предииктивный потенциал фенотипирования макрофагальной популяции в малигнизации *H. pylori*-ассоциированного хронического гастрита // Вестник РГМУ. Научный медицинский журнал РНИМУ им. Н. И. Пирогова. — 2021. — № 5. — С. 50–56. — DOI: 10.24075/brsmu.2021.044
14. Michaeli M., Tabibian-Keissar H., Schiby G., et al. Immunoglobulin gene repertoire diversification and selection in the stomach — from gastritis to gastric lymphomas. *Front. Immunol.* 2014; 5:264. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00264
15. Akasaka Y., Ishii T. Histopathology and molecular pathology of intestinal metaplasia. *Current Diagnostic Pathology.* 2007; 13(4):331–339. DOI: 10.1016/j.cdp.2007.05.008
16. *Одинцова И. А., Данилов Р. К.* Учение о тканях — основа гистологии как триединой учебной и научной дисциплины // Вопросы морфологии XXI века. Вып. 6. Сб. научных трудов / Под ред. И. А. Одинцовой, С. В. Костюкевича. — СПб.: Издательство ДЕАН, 2021. — С. 17–25.

УДК 591.466:616-003.725

¹Диндяев С. В., ¹Ромашин Ф. А., ²Касаткин Д. В., ¹Арутюнян А. С.

УЧАСТИЕ ВНЕОРГАНЫХ БИОАМИНСОДЕРЖАЩИХ СТРУКТУР В РЕГУЛЯЦИИ ПРОЦЕССОВ ГИСТОГЕНЕЗА МАТКИ КРЫС

*¹ ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия»
Минздрава России, Иваново, Российская Федерация*

² Медицинский центр «Уромед», Иваново, Российская Федерация

Аннотация: Целью работы является обобщение результатов собственных исследований и данных литературы, посвященных участию внеорганых биоаминсодержащих структур (перитонеальная жидкость, кровь, брюшина матки) в регуляции процессов гистогенеза матки в течение полового цикла, беременности и послеродового периода.