

Микроядра в мукоцитах слизистой оболочки желудка и хеликобактериоз у населения радиационно загрязненных территорий

С.Н. Лопатин¹, В.Ю. Кравцов¹, С.В. Дударенко¹, А.В. Рожко²

¹ Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург

² Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека, Гомель, Беларусь

Проведены исследования частот встречаемости микроядер в мукоцитах покровно-ямочного эпителия слизистой оболочки желудка (СОЖ) в группе лиц, проживающих на радиационно загрязненных территориях (РЗТ), и в группе лиц, которые не имели в анамнезе фактов радиационных воздействий, проживающих в г. Санкт-Петербурге. Все обследуемые являлись пациентами с диагнозом «Хронический гастрит» (по МКБ-10 K29.3). Микроядерный тест проводили ретроспективно в гистологических срезах, полученных из антральных гистобиоптатов. Наряду с микроядерным тестом, в гистобиоптатах обследуемых пациентов было проведено иммуногистохимическое определение хеликобактера.

*Выявлены достоверные различия между жителями радиационно загрязнённых территорий и лицами, которые не имели в анамнезе фактов радиационных воздействий, по показателю «Частота мукоцитов слизистой оболочки желудка с микроядрами». Максимальная частота мукоцитов с микроядрами наблюдалась у лиц, проживающих на радиационно загрязнённых территориях, слизистая оболочка желудка которых была инфицирована *Helicobacter pylori*. В группе пациентов радиационно-загрязнённых территорий с НР-ассоциированными гастритами частота встречаемости мукоцитов с микроядрами в слизистой оболочке желудка была в пять раз выше, чем у пациентов, слизистая оболочка которых не была инфицирована НР ($p < 0,01$). Таким образом, можно предположить, что *Helicobacter pylori* потенцирует мутагенные эффекты радиационного фактора.*

*Ключевые слова: *Helicobacter pylori*, микроядро, покровно-ямочный эпителий желудка, население зоны радиоактивного загрязнения местности.*

Введение

Проблема изменения окружающей среды в результате антропогенного воздействия и влияния факторов техногенных катастроф остается весьма актуальной, так как измененная экология окружающей среды может создавать реальные условия для развития соматических заболеваний, в том числе и болезней пищеварительного тракта. К числу крупнейших техногенных катастроф следует отнести и аварию на Чернобыльской АЭС.

Как известно, экологические техногенные факторы приводят к геномной дестабилизации соматических клеток и тем самым повышают риск их перерождения и возникновения злокачественных новообразований. В настоящее время доказано, что эпителиальные клетки слизистой оболочки желудка, инфицированные *Helicobacter pylori*, более чувствительны к другим повреждающим агентам по сравнению с неинфицированными клетками [8, 9]. Исходя из названных причин, проблема геномной нестабильности мукоцитов покровно-ямочного эпителия слизистой оболочки желудка у лиц с *Helicobacter pylori* – ассоциируемыми заболеваниями желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) сохраняет свою актуальность.

В комплексе тестов на мутагенность в настоящее время используется микроядерный тест [12]. Микроядро образуются в процессе деления из хромосомного материала, потерявшего контакт с веретеном деления. Они включают в себя хроматин либо ацентрических фрагмен-

тов, либо целых хромосом (хроматид). Частота встречаемости клеток с микроядрами может свидетельствовать о частоте возникновения клеток с измененными кариотипами. Микроядерный тест позволяет оценивать цитогенетическую нестабильность в клеточных популяциях *in vivo*, в том числе и в популяциях эпителиальных клеток желудочно-кишечного тракта [2, 4, 5]. Микроядерный тест, как правило, проводится в клеточных популяциях в цитологических мазках, но он применим также и к гистологическим срезам [3, 6, 7, 10].

Микроядерный тест как метод биоиндикации используется для исследования сохранившихся в архивах парафиновых блоков. Мы располагаем таким архивом, который был получен при выполнении фиброгастроскопий у 2682 больных, проходивших обследование и лечение в 1988–1993 гг. в Хойникской центральной районной больнице (г. Хойники, Хойникский район, Гомельская обл., Республика Беларусь). В настоящее время мы получили гистологические срезы и провели в них ретроспективное исследование с помощью микроядерного теста в покровно-ямочном эпителии и одновременно с микроядерным тестом – иммуногистохимическое исследование *Helicobacter pylori*.

В настоящем сообщении приводятся результаты изучения микроядерным тестом цитогенетической нестабильности в клеточных популяциях мукоцитов СОЖ у жителей радиационно загрязненных территорий с *Helicobacter pylori* – ассоциированными заболеваниями

ЖКТ и у лиц с заболеваниями ЖКТ без инфицирования бактериальными клетками *Helicobacter pylori* слизистой оболочки желудка.

Материалы и методы

Были выполнены 586 фиброгастроскопий (ФГДС) и оценены результаты у 2682 больных, проходивших обследование и лечение в 1988–1993 гг. в Хойникской центральной районной больнице (г. Хойники, Хойникский район, Гомельская обл., Республика Беларусь). Плотность загрязнения на этих территориях после аварии на ЧАЭС составляла по ^{137}Cs $7,67 \pm 0,12$ Кю/км², по ^{90}Sr – $1,15 \pm 0,01$ Кю/км², гамма-фон на местности $45,9 \pm 0,7$ мкР/ч.

Исследование проводилось в 2 группах больных, у которых гистологически был выявлен хронический гастрит с низкой степенью воспаления. В результате выполнения фиброгастроскопий в Беларуси и г. Санкт-Петербурге у 118 пациентов был выявлен хронический гастрит с низкой степенью активности. 1-я группа включала 50 жителей, постоянно проживающих (с момента аварии на ЧАЭС) в Хойникском районе и проходивших обследование и лечение в 1988–1993 гг. в Хойникской центральной районной больнице (г. Хойники, Хойникский район, Гомельская обл., Республика Беларусь). 2-я группа представлена 68 пациентами, проживающими в Санкт-Петербурге, которые проходили лечение и обследование в 2011 г. в клинике № 1 Всероссийского центра экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России (ВЦЭРМ), не имевшими в анамнезе фактов каких-либо радиационных воздействий, за исключением медицинских диагностических процедур. Средний возраст в 1-й группе был 42,6 года, во 2-й – 44,2 года. Группы обследованных с радиоактивно загрязненных территорий (РЗТ) и из Санкт-Петербурга (СПб) были дополнительно разбиты ещё на две подгруппы в зависимости от обсеменённости слизистой оболочки желудка (СОЖ) *Helicobacter pylori*. Подгруппа *Helicobacter pylori* – негативных пациентов с РЗТ («1А») включала 28 пациентов, *Helicobacter pylori* – позитивных («1Б») – 22 пациента. Группа из СПб также была разбита на две подгруппы: *Helicobacter pylori* – негативных (38 пациентов) и *Helicobacter pylori* – позитивных (30 пациентов) (табл.).

Таблица

Распределение групп пациентов с хроническим гастритом (по данным ФГДС)

Хронический гастрит	Число лиц в подгруппах на территориях			
	РЗТ		СПб	
	1А	1Б	2А	2Б
Без инфицирования СОЖ <i>Helicobacter pylori</i>	28	0	38	0
С инфицированием СОЖ <i>Helicobacter pylori</i>	0	22	0	30

Метод инструментальной диагностики включал обязательное выполнение ФГДС с одновременной биопсией СОЖ. Прицельную биопсию получали из антрального отдела желудка. Биоптаты фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина и заливали в парафин. Срезы наносили на предметные стекла. Гистологические срезы, фиксированные смесью спирт:ацетон в соотношении 1:1, в течение 10 мин высушивали на воздухе и инакти-

вировали эндогенную пероксидазу в 1% азиде натрия (Merck) в течение 15 мин. Промывали в двух сменах би-дистиллированной воды и оставляли на 5 мин в Трис-NaCl буфере (рН 7,6). До нанесения преиммунной свиной сыворотки (Novocastra) поле для иммуногистохимического анализа локализовывали гидрофобным карандашом (DakoCytomation). По окончании инкубации с преиммунной сывороткой (30 мин при комнатной температуре) наносили поликлональные кроличьи антитела (NCL-HPr, Novocastra), направленные против антигенов клеточной стенки *Helicobacter pylori*, и инкубировали препараты в течение 1 ч при +37°C. По завершении мечения первыми антителами препараты проводили в двух сменах буфера по 5 мин и наносили свиные биотинилированные антитела (DakoCytomation), направленные против кроличьих антител. Со вторыми антителами препараты инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Следующим этапом иммуногистохимической процедуры, которому предшествовала отмывка препаратов в двух сменах буфера, являлось нанесение на 10 мин при комнатной температуре системы визуализации, состоящей из растворимого комплекса – авидин и биотинилированная пероксидаза хрена (DakoCytomation). В качестве субстрата для проявления иммуногистохимической реакции использовали 3,3'-diaminobenzidine (ДАБ) в формате от фирмы Novocastra. Затем препараты докрашивали гематоксилином.

Анализ препаратов осуществлялся с использованием иммерсионного объектива (x100) на микроскопе LeicaDM 4000 В. Для определения *Helicobacter pylori* в гистологических срезах просматривали по 300 полей зрения. Положительный результат инфицирования бактериальными клетками *Helicobacter pylori* регистрировался, если на 300 полей зрения обнаруживалось не менее пяти бактериальных клеток с видоспецифичными антигенами *Helicobacter pylori*. *Helicobacter pylori* имели цвета от темно-коричневого до светло-коричневого.

Для исследования микроядер антральный отдел СОЖ был выбран потому, что в антральном отделе, в отличие от тела желудка, отсутствуют обкладочные клетки. В цитоплазме последних находятся гранулы, которые по форме и размеру могут имитировать микроядра и исказить (завысить) результаты микроядерного теста в гистологических срезах. В настоящее время доказано, что достоверных различий по количеству мукоцитов с микроядрами в теле и антральном отделе желудка не выявляется. Микроядерный тест, как правило, проводится в клеточных популяциях в цитологических мазках, но также он применим и к гистологическим срезам [2].

Подсчет микроядер в мукоцитах СОЖ проводили при увеличении x1000. В каждом наблюдении просматривали от 2400 до 15 000 мукоцитов СОЖ. При подсчетах учитывали только цилиндрические эпителиальные клетки желудочных ямок. Клетки в структуре желез не рассматривали. К клеткам с микроядрами относили мукоциты при включении следующих критериев:

- а) не допускалось при микроскопии наложения клеток друг на друга;
- б) основное ядро и микроядро располагались в цитоплазме и находились в одном оптическом поле;
- в) характер окрашивания хроматина микроядер соответствовал или был чуть бледнее окраски основных ядер;

г) микроядра имели округлую или овальную форму;
 д) границы микроядер четко очерчены и отделены от ядра клетки.

Отсутствие данных признаков являлось критерием исключения образования из числа учитываемых микроядер.

Для статистического анализа при сравнении результатов обследованных групп использовали t-критерий Стьюдента и непараметрический U-критерий Вилкоксона – Манна – Уитни.

Результаты и обсуждение

В гистологических срезах, полученных из гастробипопатов СОЖ и окрашенных гематоксилином и эозином, микроядра в мукоцитах покровно-язочного эпителия СОЖ по цвету, хроматиновой зернистости и интенсивности окрашивания чаще всего соответствовали таковым у ядер клеток, в которых они наблюдались (рис. 1). Размеры микроядер не превышали 1/4 площади ядра той же клетки, а абсолютные размеры (диаметры) микроядер в мукоцитах варьировали от 2 до 4 мкм. Форма наблюдаемых микроядер в мукоцитах всегда была идеально круглая или овальная. Микроядра располагались в мукоцитах рядом с ядром, чаще базально или апикально. Важно отметить, что в срезах, в которых наблюдались микроядра, мукоциты с микроядрами располагались рядом в пределах одной ямки или в соседних ямках покровно-язочного эпителия. Морфологически у обследованных людей на РЗТ отмечались слабо выраженные признаки отека слизистой оболочки антрального отдела желудка, эозинофильная, а также плазмоцитарная и лимфоцитарная инфильтрация слизистой оболочки.

У пациентов 1-й группы размах изменчивости по показателю «Частота мукоцитов с микроядрами» составил от 0 до 1,04‰. Средняя частота встречаемости мукоцитов СОЖ с микроядрами составила $(0,1 \pm 0,02)\%$. Во 2-й группе размах изменчивости составил от 0 до 0,4‰. Средняя частота мукоцитов СОЖ с микроядрами составила $(0,02 \pm 0,008)\%$ (рис. 2). U-критерий Вилкоксона – Манна – Уитни выявил достоверные различия по частоте встречаемости мукоцитов СОЖ с микроядрами между обследованными группами ($p < 0,01$).

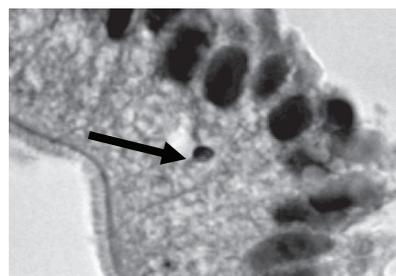


Рис. 1. Микроядро круглой формы (стрелка) в цилиндрических эпителиальных клетках слизистой оболочки желудка. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 1000$ (об. $100\times$; ок. $10\times$)

Таким образом, представленные данные указывают на наличие достоверных различий между жителями, проживающими на радиационно загрязненных территориях, и лицами, не имевшими в анамнезе фактов каких-либо радиационных воздействий, за исключением диагностических медицинских по показателю «Частота мукоцитов СОЖ с микроядрами».

Рассмотрим те же показатели, но уже с учётом обсеменённости *Helicobacter pylori*. У 1А-подгруппы *Helicobacter pylori* – негативных пациентов, проживающих на РЗТ, частота мукоцитов СОЖ с микроядрами составила $(0,06 \pm 0,017)\%$. Этот показатель достоверно отличался ($p < 0,01$) от такового в 1Б-подгруппе *Helicobacter pylori* – позитивных пациентов, проживающих на РЗТ, где частота встречаемости составила $(0,16 \pm 0,03)\%$, и 2А-подгруппе *Helicobacter pylori* – негативных пациентов, проживающих в СПб, с частотой встречаемости $(0,01 \pm 0,005)\%$. В подгруппе 2Б *Helicobacter pylori* – позитивных пациентов, проживающих в СПб, с частотой встречаемости $(0,03 \pm 0,015)\%$ достоверные различия не выявлены ($p > 0,05$) при сравнении с 1А- и 2А-подгруппами (рис. 3).

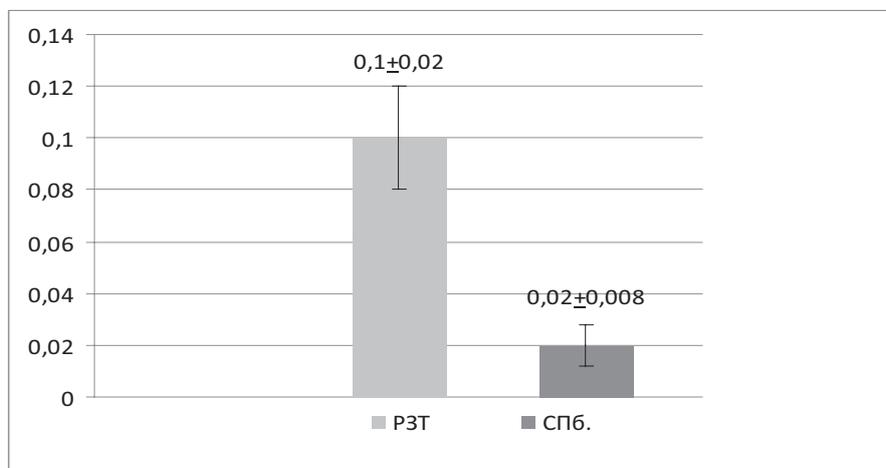


Рис. 2. Частота распределения мукоцитов с микроядрами в промилле у жителей РЗТ и СПб без учёта инфицированности *Helicobacter pylori*

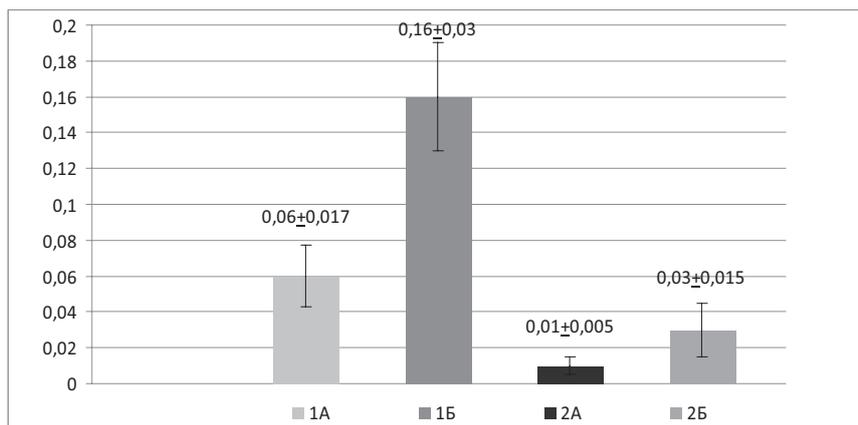


Рис. 3. Частота распределения мукоцитов с микроядрами в промилле у жителей РЗТ и СПб с учётом инфицированности *Helicobacter pylori*

Очевидно, что инфицированность СОЖ бактериальными клетками *Helicobacter pylori* сопровождается повышением частоты возникновения мукоцитов с цитогенетическими нарушениями (микроядрами) в антральном отделе СОЖ. Наибольший уровень мукоцитов с микроядрами нами выявлен у пациентов подгруппы 1Б (жители РЗТ с *Helicobacter pylori* – положительными заболеваниями ЖКТ), у которых данный показатель был в 5 раз выше аналогичного показателя у *Helicobacter pylori* – положительных пациентов из СПб.

Результаты исследования позволяют предположить, что повышенная цитогенетическая нестабильность мукоцитов данной подгруппы обусловлена усилением фактора инфицированности *Helicobacter pylori* и постоянного воздействия радиационного фактора.

Известно, что воспалительный процесс любой этиологии сопровождается иммунной реакцией. В очаге воспаления наблюдается усиление свободно-радикальных процессов, что ведет к повышению концентрации свободных радикалов и продуктов свободно-радикального окисления – супероксид радикала O₂⁻, гидроксил радикала OH⁻, пероксинитрита ONOO⁻ [1]. Хронический воспалительный процесс также сопровождается изменениями, ведущими к существенному уменьшению диффузии кислорода к клеткам эпителия; усиление мутационного процесса в эпителиоцитах обусловлено, вероятно, снижением экспрессии генов репарации ДНК при гипоксии [11]. Мутагенные эффекты свободных радикалов кислорода могут быть скорректированы антиоксидантной системой. Однако длительная колонизация бактериальными клетками *Helicobacter pylori* значительно снижает концентрацию различных антиоксидантных соединений в желудке [13].

К факторам аварии на ЧАЭС относят: социальное напряжение в обществе; психологический стресс по причине отсутствия достоверной научной информации о влиянии на здоровье факта проживания на радиоактивно загрязненных территориях (РЗТ); изменившийся рацион питания и уклад жизни постоянно проживающего на данной территории населения; возможность инкорпорации радионуклидов с пищей; воздействие малых доз внешне-

го и внутреннего облучения. По опубликованным научным данным, канцерогенный риск онкологической патологии органов системы пищеварения у населения РЗТ через 10–15 лет после аварии на ЧАЭС был ничтожно мал и не выходил за пределы среднестатистических показателей по России.

Таким образом, можно предположить, что *Helicobacter pylori* потенцирует мутагенные эффекты радиационного фактора. В связи с этим в соответствии с современными представлениями о канцерогенезе, в основе которого лежат мутагенные изменения в соматических клетках, пациенты с высокой обсемененностью *Helicobacter pylori* и проживающие на радиационно загрязнённых территориях, могут быть отнесены к группе повышенного онкологического риска. Иммуногистохимический метод, позволяющий оценивать степень обсеменённости слизистой оболочки желудка *Helicobacter pylori*, и микроядерный тест могут быть рекомендованы при обследованиях жителей, проживающих на РЗТ и страдающих заболеваниями ЖКТ.

Заключение

Выявлены достоверные различия между жителями РЗТ и лицами, которые не имели в анамнезе фактов радиационных воздействий по показателю «Частота мукоцитов СОЖ с микроядрами». Максимальная частота мукоцитов с микроядрами наблюдалась у лиц, проживающих на РЗТ, СОЖ которых была инфицирована *Helicobacter pylori*. В группе пациентов РЗТ с *Helicobacter pylori* – ассоциированными гастритами частота встречаемости мукоцитов с микроядрами в СОЖ была в пять раз выше, чем у пациентов, СОЖ которых не была инфицирована *Helicobacter pylori* ($p < 0,01$). Таким образом, можно предположить, что *Helicobacter pylori* потенцирует мутагенные эффекты радиационного фактора.

Авторы выражают благодарность В.Н. Эллиниди, Г.Г. Боярской и Т.Н. Карасевой за помощь в подготовке гистологических срезов.

Литература

1. Владимирова, Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты / Ю.А. Владимирова // Вестн. РАМН. – 1988. – № 7. – С. 43–51.
2. Кравцов, В.Ю. Хеликобактериоз и мукоциты с микроядрами в слизистой оболочке желудка у ликвидаторов последствий аварии на Чернобыльской АЭС / В.Ю. Кравцов, Л.В. Китаева // Мед.-биол. и соц.-психол. пробл. безопасности в чрезв. ситуациях. – 2011. – № 2. – С. 84–88.
3. Лисочкин, Б.Г. Ретроспективная диагностика радиационного ингаляционного поражения слизистой оболочки бронхов у ликвидаторов последствий аварии на Чернобыльской АЭС с использованием микроядерного теста / Б.Г. Лисочкин, В.Ю. Кравцов, В.В. Рыбаченко // Арх. патологии. – 2004. – № 2. – С. 17–19.
4. Мукоциты с микроядрами и обсемененность кокковыми формами *helicobacter pylori* в слизистой оболочке желудка человека / Л.В. Китаева [и др.] // Цитология. – 2008. – Т. 50, № 2. – С. 160–164.
5. Оценка мутагенной активности бутилового спирта и продуктов его хлорирования / Л.П. Сычева [и др.] // Токсикол. вестн. – 2003. – № 4. – С. 39–43.
6. Abnormal nuclear structures (micronuclei, nuclear blebs, strings, and pockets) in a case of anaplastic giant cell carcinoma of the thyroid: an immunohistochemical and ultrastructural study / R.A. Caruso [et al.] // UltrastructPathol. – 2011. – V. 35. – P. 8–14.
7. Analysis of micronuclei, histopathological changes and cell proliferation in nasal epithelium cells of rats after exposure to formaldehyde by inhalation / G. Speit [et al.] // Mutat Res. – 2011. – V. 721. – P. 35–127.
8. Chitcholtan, K. Outer membrane vesicles enhance the carcinogenic potential of *Helicobacter pylori* / K. Chitcholtan, M.B. Hampton, J.I. Keenan // Carcinogenesis. – 2008. – V. 29. – P. 5–12.
9. DNA damage and repair in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa cells / M. Arabski [et al.] // Mutat Res. – 2005. – V. 570, № 1. – P. 129–135.
10. Köhler, A. Nuclear changes in blood, early liver anomalies and hepatocellular cancers in flounder (*Platichthys flesus* L.) as prognostic indicator for a higher cancer risk? / A. Köhler, K. Ellesat // Mar Environ. Res. – 2008. – V. 66. – P. 50–149.
11. Mihaylova, V.T. Decreased expression of the DNA mismatch repair Mlh1 under hypoxic stress in mammalian cells / V.T. Mihaylova, R.S. Bindra, J. Yuan // Mol. Cell Biol. – 2003. – V. 23. – P. 3265–3273.
12. Schmid, W. The micronucleustest / W. Schmid // Mutat Res. – 1975. – V. 31. – P. 9–15.
13. Zhang, Z. *Helicobacter pylori* in gastric malignancy: role of oxidants, antioxidants and other co-factors / Z. Zhang, M. Farthing // *Helicobacter pylori*. Basic mechanisms to clinical cure / Eds. R. Hunt, G. Tytgat. – Dordrecht : Kluwer academic publishers; Boston : London, 2000. – 689 p.

S.N. Lopatin¹, V.Yu. Kravtsov¹, S.V. Dudarenko¹, A.V. Rozhko²

Micronuclei in mucocytes and *Helicobacter pylori* infection in cover-patching epithelium of the stomach in population of radioactive contaminated areas

¹All-Russia Center of Emergency and Radiation Medicine named by A.M. Nikiforov Of the Ministry of Russian Federation for Civil Defense, Emergencies and Elimination of Consequences of Natural Disasters, Saint-Petersburg

²The Republican Research Centre for Radiation Medicine and Human Ecology, Gomel, Belarus

Abstract. *The investigation of frequencies of micronuclei in mucocytes cover-patching epithelium of the gastric mucosa (GM) in the group of persons living in the contaminated territories (RZT) and in the group of persons who had not a history of radiation exposure, living in Saint-Petersburg. All respondents were patients with chronic gastritis (ICD-10K29.3). Micronucleus test was carried out retrospectively in histological sections obtained from antral gastrobiopstatov. Along with the micronucleus test in gastrobiopstatoh examined patients were conducted immunohistochemical determination of H. pylori.*

There were significant differences between the residents of contaminated areas and those who have not had a history of radiation exposure in terms of "frequency of mukotsitov gastric mucosa with micronuclei." Maximum frequency of mucocytes with micronuclei was observed in individuals living in radiation-contaminated areas gastric mucosa which was infected with Helicobacter pylori. In the group from radiation-contaminated areas with HP-associated gastritis incidence mucocytes with micronuclei in the gastric mucosa was five times higher than that of patients whose mucosa was not infected HP (p < 0.01). Thus, we can assume that the Helicobacter pylori potentiates the mutagenic effects of radiation factor.

Key words: *Helicobacter pylori, micronuclei, cover-patching epithelium of the stomach, the population of radioactive contaminated area.*

Поступила: 17.09.2012 г.

Лопатин С.Н.
Тел.: 89111620272
E-mail: Lopatinspb05@mail.ru