

Структурно-функциональное состояние слизистой оболочки желудка и его микробиоценоз при хроническом гастрите у детей

А. А. Казимилова, Е. Л. Казачков

Кафедра патологической анатомии с секционным курсом ГОУ ВПО «Челябинская государственная медицинская академия Росздрав», г. Челябинск

Structure functional status of gastric mucous tunic and its microbiocenosis on chronic gastritis at children

A. A. Kazimirova, E. L. Kazachkov

Резюме

Цель исследования — оценить морфофункциональное состояние компонентов слизиобразующего аппарата желудка в зависимости от его микробиоценоза при хроническом гастрите у детей.

Объектами исследования стали гастробиоптаты от 55 детей в возрасте от 7 до 15 лет с диагнозом хронический гастрит (ХГ), которые сформировали две группы: 1-я — 35 пациентов с *Helicobacter pylori* (*H.pylori*)-ассоциированным ХГ; 2-я группа — 20 больных с *H.pylori*-неассоциированным ХГ. В работе использованы гистологический, гистохимический, лектиногистохимический, морфометрический, бактериологический и статистический методы исследования.

При *H.pylori*-ассоциированном ХГ зарегистрировано более выраженное перераспределение рецепторов к лектинам, чем при ХГ, не связанном с *H.pylori*, что выразилось в повышении уровня связывания клетками лектинов, имеющих сродство к фукомуцинам, и снижении содержания рецепторов к лектинам, селективно реагирующим с сialовыми кислотами (падение уровня сialомуцинов) ($p < 0,05$). Показано, что нарушения микробиоценоза желудка при *H.pylori*-ассоциированном и при *H.pylori*-неассоциированном ХГ также имеют достоверные различия.

Ключевые слова: хронический гастрит у детей, лектиногистохимия, микробиоценоз желудка.

Summary

The purpose of the research is to estimate morphofunctional condition mucus-producing apparatus of gaster according to its microbiocenosis at chronic gastritis.

The objects of the research were gastric biopsy materials from 55 children at the age from 7 to 15 with diagnosis chronic gastritis (CG) which were divided into two groups: the 1st group — 35 patients with *Helicobacter pylori* (*H.pylori*)-fssociated CG; the 2nd — 20 patients with *H.pylori*-nonassociated CG. During the work there were used histologic, histochemical, lectinhistochemical, morphometric, bacteriologic and statistic methods.

There was registered more evident recombination of the lectin receptors on *H.pylori*-associated CG than on *H.pylori*-nonassociated CG, that was expressed by the elevation of the level of lectin connection by the cells having affinity to the Foucault mucins, and the reduction of the lectin receptors selectively reacting with the sialic acids (reduction of sialomucins's level) ($p < 0,05$). It was found out that microbiocenosis disorders on *H.pylori*-associated CG and *H.pylori*-nonassociated CG have significant differences.

Key words: chronic gastritis at children, lectinhistochemistry, microbiocenosis of gaster.

Введение

Эубиотическое состояние желудка обусловлено составом прикрепленного слизевого геля и низкой величиной рН, лимитирующими рост микроорганизмов. Важнейшими компонентами мукопротективного аппарата слизистой оболочки желудка (СОЖ) принято считать секреторные гликопротеины — белки, содержащие концевые олиго- и моносахаридные цепи [1,2]. Колонизация СОЖ *Helicobacter pylori* (*H.pylori*)

неизбежно приводит к нарушению синтеза и активации комплекса цитокинов в структурных компонентах слизистой оболочки, что обуславливает развитие воспаления, его хронизацию и формирование дисрегенераторных процессов. Эти изменения рассматриваются как ключевые звенья патогенеза хронического гастрита (ХГ) [3], причем нельзя исключить, что дисбаланс в системе «альтерация-репарация» может быть связан и с другой, негеликобактерной инфекцией, колонизирующей СОЖ.

Проблеме ХГ посвящены многие фундаментальные исследования. Однако до сих пор

А. А. Казимилова — кандидат медицинских наук;

Е. Л. Казачков — зав. кафедрой патологической анатомии с секционным курсом Чел. государственной медицинской академии, д. м. н., профессор.

остаются неясными механизмы нарушения защитных барьеров СОЖ при изменении микробиоценоза желудка и, в первую очередь, прикрепленного слизевого геля.

В настоящее время процессы накопления, перераспределения и извращения синтеза гликоконъюгатов в тканях принято изучать с помощью лектиногистохимических методов. С этой целью предложено использовать наборы лектинов различной углеводной специфичности, которые позволяют проводить избирательную идентификацию гликопротеинов [4]. В связи с насыщенностью структур СОЖ углеводсодержащими биополимерами, а также крайней малочисленностью работ по лектиногистохимическому изучению слизиобразующего аппарата [2] и микробиоценоза желудка [5] у детей с *H. pylori*-ассоциированным и *H. pylori*-неассоциированным ХГ, эти исследования представляются актуальными.

Цель исследования — оценить морфофункциональное состояние компонентов слизиобразующего аппарата желудка в зависимости от его микробиоценоза при хроническом гастрите у детей.

Материал и методы исследования

Объектами настоящего исследования стали гастробиоптаты от 55 детей в возрасте от 7 до 15 лет (33 девочки и 22 мальчика, средний возраст — 11,5 лет). Все дети при поступлении в стационар имели предварительный диагноз: «Функциональная диспепсия» либо «Хронический гастрит», который уточнялся после проведения комплекса диагностических методов исследования.

Критериями включения пациентов в исследование были: возраст 7-15 лет; наличие клинико-морфологических признаков ХГ; информированное согласие родителей пациентов на проведение исследования. Критерии исключения: прием антибактериальных, антисекреторных или нестероидных противовоспалительных препаратов в предшествующие обследованию 3 месяца; наличие сочетанных заболеваний, способных оказать влияние на течение ХГ.

Диагноз *H. pylori*-ассоциированного ХГ устанавливался в ходе комплексного клинического исследования с использованием фиброгастроуденоскопии с последующим морфологическим изучением биоптатов из тела и антрального отдела желудка (из каждого по 2 биоптата), а также на основании *H. pylori*-диагностики: гистобактериоскопический метод с окраской по Гимзе и серологический метод. Всего исследовано 340 гастробиоптатов с учетом рекомендаций модифицированной Сиднейской классификации ХГ: гистологический тип, топография, активность процесса, степень обсемененности *H. pylori*, наличие, характер эрозий и метаплазии, состояние лимфатических узелков.

В зависимости от результатов эндоскопического и морфологического исследования были сформированы следующие группы пациентов: 1-я — дети с *H. pylori*-ассоциированным ХГ (35 наблюдений); 2-я — пациенты с *H. pylori*-неассоциированным ХГ (20 больных).

В работе использованы следующие морфологические методы исследования: гистологический, гистобактериоскопический, гистохимический, лектиногистохимический, морфометрический.

Для визуализации углеводных детерминант гликопротеинов в гастробиоптатах применен набор лектинов различной специфичности [6], меченых пероксидазой хрена (НПО «Лектинотест», Украина). Для обработки срезов были использованы лектин завязей пшеницы (WGA), конканавалин А (CCA), лектин сои (SBA), лектин клещевины (RCA), лектин бузины черной (SNA) и лектин бобовника анагирилистного (LAL) (табл. 1).

Оценка результатов лектиногистохимического исследования осуществлялась полуколичественным методом при сравнении с контролем: выраженная интенсивность связывания лектина обозначалась «+++», умеренная — «++», слабая — «+», отсутствие связывания лектина — «-» [4].

У детей 1-й и 2-й групп исследовали количественный и качественный состав микрофло-

Таблица 1. Лектины, использованные для лектиногистохимического исследования

Название лектина	Обозначение*	Углеводная специфичность (аббревиатура)
Лектин завязей пшеницы	WGA	N-ацетил-D-глюкозамин (NacDGlc)
Конканавалин А	con A	α -D-манноза (α DMan)
Лектин сои	SBA	N-ацетил-D-галактозамин (NacDGal)
Лектин клещевины	RCA	α -D-галактоза (α DGal)
Лектин бузины черной	SNA	N-ацетилнейраминавая (сиаловая) кислота (NacNeu)
Лектин бобовника анагирилистного	LAL	L-фукоза (LFuc)

Примечание. * — сокращения наименований лектинов и аббревиатура представлены в соответствии с Международной номенклатурой лектинов [6].

ры желудка. Микробный состав биоценоза желудка изучали бактериологическим методом — исследовали по два биоптата СОЖ и пристеночной слизи (фундальный отдел).

В качестве транспортной среды для материала, подлежащего исследованию на анаэробы, использовали среду BBL «Port-A-Cul», для материала, подлежащего исследованию на аэробную флору — 0,9% раствор натрия хлорида. Качественный посев производился на плотные и жидкие питательные среды с целью обнаружения возможных микроорганизмов. Количество бактерий определяли путем подсчета колониеобразующих единиц в 1 г биоптата (lg КОЕ/г) с учетом массы биоптата, количества посевного материала и разведения. Для выделения облигатных анаэробов использовали системы BBL Crystal фирмы «Becton Dickinson» (USA). Идентификацию выделенного микроорганизма осуществляли с использованием электронной версии.

Идентифицировали культуры по морфологическим, культуральным, биохимическим тестам согласно «Определителю бактерий Берджи» [7] по стандартным методикам [8, 9]. Критерием для проведения анализа данных бактериологического исследования служил титр $\times 10^3$ КОЕ/г [5].

Достоверность различий величин в группах по изучаемым факторам оценивали по критерию Стьюдента (различие средних). Для расчета достоверности различий в малых группах применялся непараметрический критерий — точный критерий Фишера (односторонний вариант). Расчеты выполнены с помощью персонального компьютера программы «Statistica 6,0» для операционной системы «Windows-XP».

Результаты

Микробный пейзаж при *H.pylori*-неассоциированном ХГ был представлен аэробной и анаэробной флорой (табл. 2). Большую часть среди аэробов составили патогенные микроорганизмы: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus pyogenes* (gp. A). Они выявлялись у 18 из 20 больных ($p < 0,05$). Анаэробная флора была представлена пептококками в титрах, превышающих диагностические: *Peptococcus anaerobicus*, *Peptococcus prevotii*. У 6 детей патогенные и условно-патогенные микроорганизмы выявлялись в ассоциации. В то же время у половины больных этой группы обнаруживались бифидо- и лактобактерии.

При патогистологическом исследовании гастробиоптатов у большинства пациентов с *H.pylori*-неассоциированным ХГ (у 17 из 20 больных) выявлялись признаки неактивного или слабоактивного ХГ и только трое пациентов имели умеренную активность воспаления в

Таблица 2. Микробиоценоз желудка при *H.pylori*-неассоциированном хроническом гастрите у детей

№	Культивируемый микроорганизм	КОЕ/г	n=20
1.	<i>Escherichia coli</i>	10^6	4
2.	<i>Staphylococcus aureus</i>	10^5	5
3.	<i>Streptococcus viridans</i>	10^4	8
4.	<i>Streptococcus pyogenes</i> (gp. A)	10^3	10
5.	<i>Peptostreptococcus anaerobicus</i>	10^3	2
6.	<i>Peptococcus prevotii</i>	10^4	2
7.	<i>Bifidobacterium speciaens</i>	10^4	10
8.	<i>Lactobacillus speciaens</i>	10^2	8

Таблица 3. Микробиоценоз желудка при *H.pylori*-ассоциированном хроническом гастрите у детей

№	Культивируемый микроорганизм	КОЕ/г	n=35
1.	<i>Escherichia coli</i>	-	-
2.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10^3	2
3.	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
4.	<i>Streptococcus viridans</i>	10^4	2
5.	<i>Streptococcus pyogenes</i> (gp. A)	10^4	2
6.	<i>Eubacterium limnosum</i>	10^5	1
7.	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	10^4	1
8.	<i>Peptostreptococcus prevotii</i>	-	-
9.	<i>Candida albicans</i>	10^3	8
10.	<i>Bifidobacterium speciaens</i>	10^4	2
11.	<i>Lactobacillus speciaens</i>	10^2	2

СОЖ. У всех детей воспалительный процесс был поверхностным, а признаки атрофии, мета- и дисплазии отсутствовали.

В микробиоценозе желудка при ХГ, ассоциированном с *H.pylori* (табл. 3), также отмечались изменения. Среди патогенной аэробной флоры обнаруживались в виде монокультур *Staphylococcus epidermidis*, *S.pyogenes* (gp. A) и *S.viridans*. Анаэробная флора была представлена *P.anaerobius* и *Eubacterium limnosum*. В отличие от неассоциированного с *H.pylori* ХГ, при котором не зарегистрировано ни одного случая выявления *Candida albicans*, при *H.pylori*-ассоциированном ХГ этот патоген культивировался в титре 10^3 КОЕ/г у 8 пациентов. Бифидо- и лактобактерии присутствовали лишь у 4 детей из 35 (в виде монокультур), что достоверно меньше, чем в группе детей с *H.pylori*-неассоциированным ХГ ($t=4,95$, доверительный уровень $>99,9\%$). У 20 пациентов из 35 пациентов этой группы другая бактериальная флора, кроме *H.pylori*, не культивировалась ($t=6,05$, доверительный уровень $>99,9\%$).

Ассоциация микроорганизмов (кроме *H. pylori*) была выявлена у одного больного, что также достоверно реже, чем при *H. pylori*-неассоциированном ХГ ($t=3,07$, доверительный уровень 99-99,9%).

При патогистологическом исследовании гистобиоптатов у большинства пациентов с *H. pylori*-ассоциированным ХГ (у 30 из 35 больных) выявлялись признаки высоко- или умеренно активного ХГ, и только пятеро пациентов имели слабую активность воспаления в СОЖ. У всех детей воспалительный процесс был поверхностным, признаки атрофии, мета- и дисплазии выявить не удалось.

Установлено, что при *H. pylori*-неассоциированном ХГ возникает перераспределение рецепторов к лектинам в эпителиоцитах СОЖ, указывающее на структурные изменения в углеводной цепочке гликопротеинов (табл. 4). Отмечено умеренное ослабление связывания WGA и SNA рецепторами всех клеток, реагирующих с этими лектинами в норме, особенно поверхностных эпителиоцитов желудочных ямок, что указывает на обеднение местных гликопротеинов сиаловыми кислотами. Наряду с этим, нарастала интенсивность связывания LAL покровно-ямочными клетками, что, вероятно, следует связать с повышением содержания в этих эпителиоцитах гликоконъюгатов, богатых терминальной фукозой.

При *H. pylori*-ассоциированном ХГ выявлено существенное перераспределение рецепторов к лектинам, указывающее на более глубокие структурные изменения в углеводной цепочке гликопротеинов (табл. 5). Так, отмечено значительное ослабление связывания WGA и SNA рецепторами всех клеток, реагирующих

с этими лектинами при *H. pylori*-неассоциированном ХГ, особенно поверхностных эпителиоцитов желудочных ямок. Отмечалось и умеренное ослабление связывания лектинов с рецепторами к SBA, RCA.

Вместе с тем, продолжала увеличиваться интенсивность связывания LAL покровно-ямочными клетками (повышение содержания гликоконъюгатов, богатых терминальной фукозой). Следует отметить, что данный параметр значительно превышал таковой при *H. pylori*-неассоциированном ХГ:

Обсуждение

Выявленное перераспределение рецепторов к лектинам в элементах слизь-образующего аппарата СОЖ в виде обеднения прикрепленного слизистого геля сиаломуцинами и обогащения фукомуцинами обуславливает ослабление его протективных свойств и может поддерживать установленный нами микробиологический дисбаланс как при *H. pylori*-индуцированном, так и при *H. pylori*-неассоциированном ХГ. Это благоприятствует дальнейшей колонизации и персистенции в СОЖ как *H. pylori*, так и другой патогенной и условно-патогенной микрофлоры, обуславливает развитие и прогрессирование дистрофических и воспалительно-дисрегенераторных процессов при данной патологии.

Более выраженные качественные нарушения слизеобразования при *H. pylori*-ассоциированном ХГ указывают на способность данного патогена, с одной стороны, вызывать деградацию гликопротеинов желудочной слизи, а с другой — приводить к повреждению и дегенерации эпителиоцитов, что было отме-

Таблица 4. Интенсивность связывания лектинов рецепторами эпителиоцитов слизистой оболочки желудка при *H. pylori*-неассоциированном хроническом гастрите у детей (n=20)

Углеводная специфичность	WGA (NAcDGlc)	con A (α DMan)		SBA (NAcDGal)	RCA (α DGal)	SNA (NAcNeu)	LAL (LFuc)
Поверхностно-ямочные эпителиоциты фундального отдела желудка	++	40	+ 10	++ 55	++ 45	++ 55	++ 70
Покровные эпителиальные клетки перешейка фундальных желез	++	45	- 0	++ 40	++ 50	+ 25	+++ 60
Покровные эпителиальные клетки глубины ямок фундальных желез	++	15	- 0	+ 20	+ 25	+ 15	++ 50
Слизистые (добавочные) клетки шеек фундальных желез	+	20	- 0	+ 25	+ 20	+ 15	++ 60
Эпителиоциты желудочных ямок пилорического отдела	++	60	+ 5	++ 30	+ 20	- 0	++ 40
Эпителиоциты коротких пилорических желез	+	50	- 0	++ 30	+ 20	+ 15	++ 40

Примечание. «+++» — выраженная интенсивность связывания лектина,

«++» — умеренная интенсивность связывания,

«+» — слабая интенсивность связывания,

«-» отсутствие связывания;

арабские цифры — процент положительных результатов при использовании определенных лектинов.

Таблица 5. Интенсивность связывания лектинов рецепторами эпителиоцитов слизистой оболочки желудка при *H. pylori*-ассоциированном хроническом гастрите у детей (n=35)

Углеводная специфичность	WGA (NAcDGlc)		сop A (α DMan)		SBA (NAcDGal)		RCA (α DGal)		SNA (NAcNeu)		LAL (LFuc)	
	+		+		+		+		+		+	
Поверхностно-ямочные эпителиоциты фундального отдела желудка	+	35	+	15	++	40	++	30	+	30	+++	75
Покровные эпителиальные клетки перешейки фундальных желез	+	30	-	0	+	25	+	30	+	15	+++	70
Покровные эпителиальные клетки глубины ямок фундальных желез	+	10	-	0	+	10	+	20	-	0	++	50
Слизистые (добавочные) клетки шеек фундальных желез	+	10	-	0	+	10	+	10	-	0	++	45
Эпителиоциты желудочных ямок пилорического отдела	+	45	-	0	+	20	+	10	-	0	++	35
Эпителиоциты коротких пилорических желез	+	35	-	0	+	20	+	10	+	5	++	25

Примечание. «+++» — выраженная интенсивность связывания лектина,
«++» — умеренная интенсивность связывания,
«+» — слабая интенсивность связывания,
«-» — отсутствие связывания;
арабские цифры — процент положительных результатов при использовании определенных лектинов.

чено ранее и другими авторами [5, 10, 11]. Имеющиеся изменения состава слизевого геля при ХГ вне ассоциации с *H. pylori* позволяют предположить агрессивность негеликобактерной патогенной и условно-патогенной микрофлоры. В связи с этим становится очевидным значение микроорганизмов, не характерных для данного биотопа, в генезе ХГ, в том числе, и его «эксгеликобактерного» варианта.

Высокая частота регистрации ассоциации *H. pylori* с *S. albicans* может указывать на симбиотические взаимоотношения этих инфектов, что подтверждают литературные данные [12]. В тоже время, антагонизм *H. pylori* по отношению к другим патогенным и условно-патогенным микроорганизмам препятствует колонизации ими СОЖ.

В связи с частым отсутствием у наших пациентов с геликобактерным ХГ бифидо- и лактобактерий, можно предположить, что антагонистическое воздействие *H. pylori* распространяется и на зубиотическую микрофлору желудка. Подтверждением этого обстоятельства может служить тот факт, что в отсутствие бифидо- и лактобактерий облегчается реализация патогенных свойств *H. pylori* [10, 13].

Таким образом, результаты настоящего исследования позволяют сделать вывод о том, что изменения микробиоценоза желудка и количественно-качественные трансформации гликопротеинов прикрепленного слизистого геля находятся во взаимозависимых отношениях. Обнаруженные нарушения микробиоценоза желудка и связанные с ними изменения состава прикрепленного слизистого геля влияют на структурные характеристики ХГ у де-

тей, диктуют необходимость оптимизации терапевтических подходов, требуют комплексной и дифференцированной коррекции данной патологии в зависимости от микробного пейзажа желудка и состояния его слизеобразующего аппарата.

Литература

1. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека. М: Медицина; 1993.
2. Луцик А. Д., Зербино Д. Д. Применение лектинов в патоморфологии: итоги и перспективы. Арх. патологии. 1988; 3:77-81.
3. Голофеевский В. Ю. Введение в клиническую морфологию желудка и двенадцатиперстной кишки. СПб: Фолиант; 2005.
4. Луцик А. Д., Детюк Е. С., Луцик М. Д. Лектины в гистохимии. Львов: Вища школа; 1989.
5. Еникеев Д. А., Нижевич А. А., Хасанов Р. Ш. Хеликобактерные гастриты у детей. Уфа; 2001.
6. Bob-Hansen T. S., Breborowich J. Lectins biology, biochemistry, clinical biochemistry. Proc.VI lectin meeting; Germany, Berlin; 1985; 4:126-380.
7. Хоулта Дж., Криг Н., Снит П. (редакторы). Определитель бактерий Берджи: в 2 т.: пер. с англ. М: Мир; 1997.
8. Основные методы лабораторных исследований в клинической бактериологии. Рук-во ВОЗ, Женева; 1994.
9. Поздеев О. К. Медицинская микробиология. М: ГЭОТАР-Медиа; 2001.
10. Исаков В. А., Домарадский И. В. Хеликобактериоз. М: Медпрактика; 2003.
11. Malferheiner P. Maastricht guidelines: an evolving concept Maastricht-3 Guidelines for Helicobacter pylori infection: 13ng United European Gastroenterology Week. Copenhagen, 2005.
12. Баженов Л. Г., Перепелова И. Н. Helicobacter pylori и грибы рода Candida при гастродуоденальной патологии. Журн. микроб., эпидемиол., иммуногет. 1997; 3:100-1.
13. Симаненков В. И., Захарова Н. В., Боваева Д. И., Соловьева О. И. Применение пробиотиков в терапии Helicobacter pylori-ассоциированных гастритов. Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. 2002; 5(12):37.

Рисунок. Морфологическая семиотика ОПЛ/ОРДС:

- а) Мегакарициты в сосудах микроциркуляторного русла легкого. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$.
- б) Альвеолярный отек. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 40$.
- в) Экспрессия Миелопероксидазы в легком при ОПЛ. Иммунопероксидазный метод. $\times 100$.
- г) Экспрессия CD 68 в легком при ОРДС. Иммунопероксидазный метод. $\times 100$.
- д) Экспрессия РСК в эпителии бронха при отсутствии ее в альвеолярном эпителии при ОРДС. Иммунопероксидазный метод. $\times 100$.
- е) Экспрессия CD 31 в легком при ОРДС. Иммунопероксидазный метод. $\times 400$.

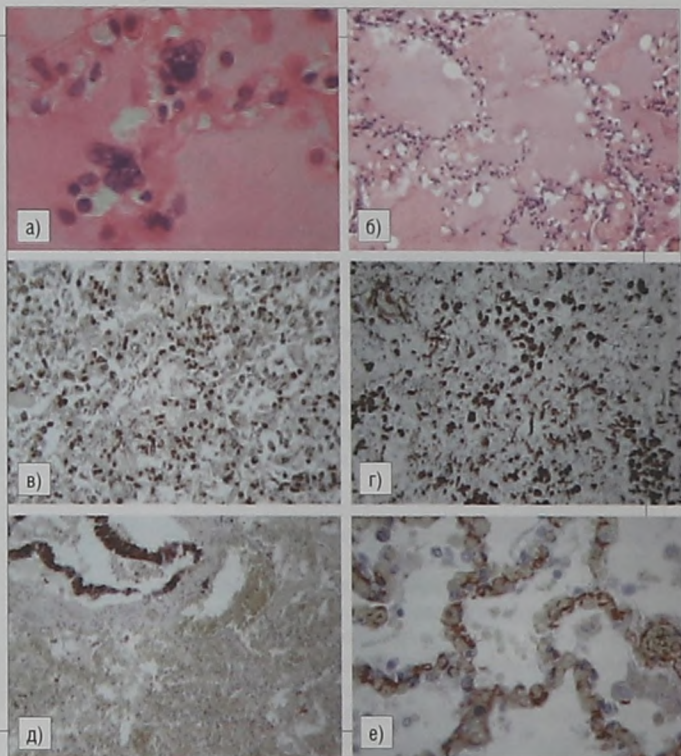
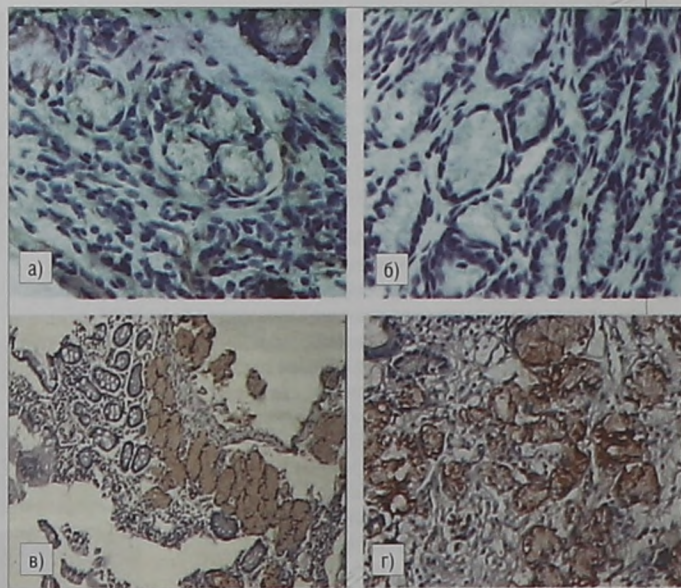


Рисунок к статье А. А. Казимировой и Е. Л. Казачкова

Рисунок. Лектиногистохимическая характеристика гастро-биоптатов при H. pylori-ассоциированном хроническом гастрите:

- а) Снижение интенсивности реакции связывания лектина зародышей пшеницы (WGA) гландулоцитами пилорических желез (снижение уровня N-ацетил-D-глюкозамина и сиаловых кислот);
- б) Исчезновение рецепторов к лектину бузины черной (SNA) из покровно-ямочных эпителиоцитов и гландулоцитов фундальных желез (падение уровня сиаломуцинов);
- в) Исчезновение рецепторов к лектину бузины черной (SNA) из покровно-ямочных эпителиоцитов и гландулоцитов антральных желез (падение уровня сиаломуцинов);
- г) Высокая интенсивность связывания гландулоцитами желез антрального отдела лектина бобовника анагирилистного (LAL) (гликопротеины фундального отдела желудка богаты фукомуцинами).



Окраска: а-г — прямой лектиногистохимический метод. Увеличение: а, б — ок. 10, об. 40; в, г — ок. 10, об. 20.