

И.К. Кондаков, В.Ю. Гальчинская, А.Б. Шитова

## Оценка эффективности антихеликобактерной терапии у больных хроническим атрофическим гастритом, ассоциированным с *H. PYLORI*

Институт терапии им. Л.Т.Малой АМН Украины, г. Харьков.

**Ключевые слова:** Де-нол, эрадикация, биопсии желудка, электронная гистохимия, *Helicobacter pylori*.

### Оцінка ефективності антихелікобактерної терапії хворих на хронічний атрофічний гастрит, асоційований з *H. pylori*

*І.К. Кондаков, В.Ю. Гальчинська, Г.Б. Шитова*

Эффективное лечение хронического атрофического гастрита, ассоциированного с *H. pylori*, возможно только в случае полной эрадикации бактерий. Морфологично й ультраструктурно на первинних біопсіях встановлено наявність хелікобактерій в епітелії шлунка, що затруднює ерадикацію *H. pylori* антибіотиками. Електронно-гістохімічний аналіз повторних біопсій, після курсу ерадикаційної терапії з використанням препарату «Де-нол» виявив наявність солей висмуту в епітелії, власній пластинці, стромі залоз, а також у моноцитах/макрофагах клітинного інфільтрату. Висока пенетрантність препарату «Де-нол» забезпечила повну ерадикацію слизової оболонки шлунка, включаючи і внутрішньоклітинні бактерії.

*Ключові слова:* Де-нол, ерадикація, біопсії шлунку, електронна гістохімія, *Helicobacter pylori*.

*Патологія.* – 2009. – Т.6., №1. – С.43-46

### Evaluation of EFFECTIVENESS of antihelicobacter therapy in Patients with chronic atrophic gastritis, associated with *H. pylori*

*I.K. Kondakov, V.Yu. Galchinskaya, A.B. Shitova*

The efficient treatment of chronic atrophic gastritis, associated with *H. pylori*, is possible only in case complete bacterial eradication. The morphological and ultrastructural investigation of primary biopsies established *H. pylori* availability in gastric epithelial cells, that prevents eradication of *H. pylori* by antibiotics. Electron-histochemical analysis of recapitulative biopsies indicated availability of bismuth salt into the epithelium, the mucosal stroma and as well in monocyte/macrophages infiltrate after course of eradication therapy with use De-Nol. The high penetration of the De-Nol provided complete eradication of gastric mucosa, including intracellular bacteria.

*Key words:* De-Nol, eradication, gastrobiopsies, ultrahistochemistry, *Helicobacter pylori*

*Patologia.* 2009; 6(1): 43-46

Эффективность лечения язвенной болезни желудка тесно связана с санацией слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки от *H. pylori*. Обладая мощным арсеналом ферментов, способностью менять рН среды, а также высокой подвижностью, *H. pylori* проникают сквозь слой слизи и располагаются на поверхности эпителиальных клеток. Это защищает бактерии не только от разрушающего действия соляной кислоты, но и от ряда лекарственных препаратов. До настоящего времени было постулировано, что *H. pylori* не является внутриклеточным паразитом, а обитает на поверхности эпителия, иногда проникая в межклеточные пространства [1]. Однако, в последние годы появились сообщения, что *H. pylori* способен проникать в цитоплазму клеток эпителия желудка и образовывать там крупные вакуоли, содержащие колонии жизнеспособных бактерий [2, 3]. В этих вакуолях *H. pylori* навязывает клетке поддержание необходимого рН среды, обеспечивая тем самым сохранение подвижности бактерий и их способности к репликации, не оказывая влияния на жизнеспособность клетки-хозяина [4]. Кроме того, установлено, что многие антибиотики и, в частности гентамицин, не способны проникать в цитоплазму эпителиальных клеток, что повышает толерантность *H. pylori* к антибиотикотерапии [5]. После прекращения терапии хеликобактеры могут вновь возвращаться во внеклеточное пространство, обсеменяя непораженные клетки эпителия [6]. Биологический смысл эпителиального клиренса *H. pylori* - выживание бактерий в ответ на лекарственные воздействия. Понятно, что в этом случае эффективность эрадикации будет зависеть от пенетрантности лекарственного препарата, т.е. от его способности проникать вглубь ткани и фикса-

ции в эпителиоцитах.

Как показывает клиническая практика, среди противоязвенных средств, способных уничтожить *H. pylori*, предпочтение отдают препаратам, содержащим висмут. Однако, причины высокой эффективности висмут содержащих препаратов до сих пор остаются малоизученными.

**Целью** настоящего исследования было изучить, с использованием методов световой и электронной гистохимии, клиническую эффективность висмут содержащего препарата «Де-нол» производства фирмы «Yamanouchi» при лечении хронического атрофического гастрита, ассоциированного с *H. pylori*.

#### Материал и методы исследования

Материалом исследования служили гастробиопсии антрального отдела желудка 20 больных хроническим атрофическим хеликобактерным гастритом выраженной степени (++++) по Сиднейской системе. Гастробиопсии брали при поступлении больного в стационар и после курса антихеликобактерной терапии. Эрадикацию проводили с использованием квадротерапии согласно Маастрихтскому консенсусу-3 и согласно решению Американской коллегии гастроэнтерологов по лечению инфекции *H. pylori* [7, 8]. В отличие от первой линии, во второй в схему эрадикационной терапии был добавлен препарат коллоидного субцитрата висмута («Де-нол» фирмы Yamanouchi). До и после курса антихеликобактерной терапии на повторных гастробиоптатах ставили электронно-гистохимическую реакцию по методу Хауга [9], позволяющую выявлять в клетках и тканях минимальные количества висмута. В результате гистохимической реакции висмут-положительный материал окрашивается от темно-коричневого до черного цвета. Биоптаты желуд-

ка фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида в течение суток. После отмывания в растворе фосфатного буфера (рН=7,5) кусочки дофиксировали в 2% растворе тетроксид осмия, обезвоживали в батарее спиртов возрастающей концентрации, ацетоне и заливали в эпон-аралдит (Fluka). Полутонкие срезы окрашивали по Arraісіo [10], исследовали и фотографировали с помощью микроскопа Olympus VX-41. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом, цитратом свинца, исследовали и фотографировали в электронном микроскопе ЭМВ 100 АК (Сумы).

#### Результаты исследования

По данным световой микроскопии, при поступлении больных в стационар, во всех отобранных для исследования гастробиоптатах выявлялся хронический атрофический гастрит выраженной степени. Морфологически, общим для всех наблюдений, в слизистой оболочке желудка было уменьшение количества желез, как за счет истинной атрофии, так и инфильтрации лейкоцитами собственной пластинки и ямочного эпителия желудка. В фундальных отделах желез имело место уменьшение числа париетальных и главных клеток. В последних отмечалось нарушение полярности эпителия.

На полутонких срезах в слое слизи и на поверхности покровного и ямочного эпителия выявлялось различное число хеликобактера в виде скопления мелких спиралевидных образований (рис. 1 а, цв. вкладка 4).

В строме желез наблюдалась выраженная гиперплазия гладкомышечных клеток, сопровождаемая гиперпродукцией ретикулиновых и эластических волокон. Строма желез инфильтрирована большим числом лейкоцитов, которые раздвигают собственные железы, создавая иллюзию атрофии (рис. 1 б, цв. вкладка 4).

Ультраструктурно, на поверхности ямочного эпителия располагаются вегетативные формы бактерий. В местах контакта *H. pylori* с поверхностью париетальных клеток отмечается деструкция и десквамация ресничек (рис. 2 а).

Практически во всех гастробиоптатах адгезия бактерий к поверхности ямочного эпителия сопровождалась вакуолизацией цитоплазмы клеток. В цитоплазматических вакуолях этих эпителиоцитов располагались вегетативные и кокковые формы бактерий.

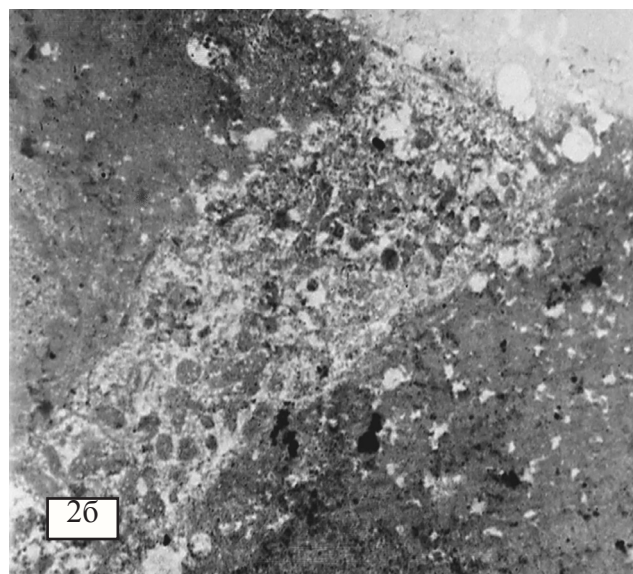
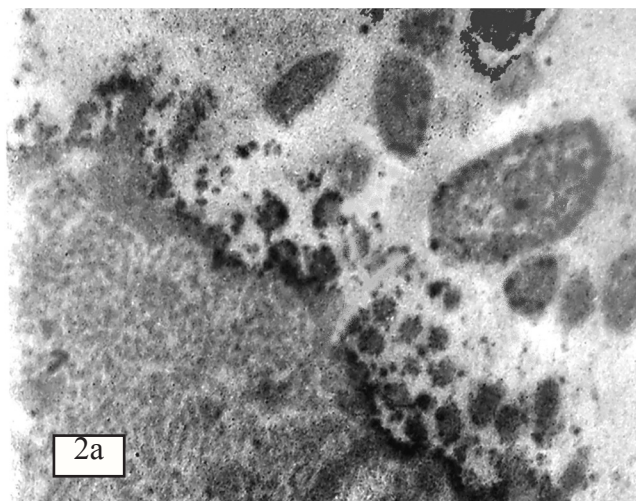


Рис. 2. Электроннограммы гастробиоптатов слизистой оболочки желудка до лечения. А – наличие вегетативных форм *H. pylori* на поверхности париетальной клетки. Гибель и десквамация микроворсинок на поверхности плазмалеммы эпителиоцита. Реакция по Хаугу. ТЭМ. X18000. Б – гиперсекреция париетальной клетки (светлая), заключенной между двумя слизистыми клетками шеечного эпителия. Отсутствие микроворсинок на поверхности плазмалеммы, гипертрофия митохондрий и цистерн эндоплазматического ретикулума париетальной клетки, большое число секреторных вакуолей в апикальной части цитоплазмы клетки. Реакция по Хаугу. ТЭМ. X9500.

Установленная нами на биопсийном материале возможность *H. pylori* проникать в цитоплазму эпителиоцитов и колонизировать их находит свое подтверждение в экспериментальных исследованиях [11, 12]. Клеточные и молекулярные механизмы проникновения бактерии в клетку хозяина до сих пор остаются малоизученными. По мнению одних авторов *H. pylori* секретирует бактериальный белок Саg А, который, проникая в клетку эпителия желудка, через секреторную систему IV типа изменяет архитектуру цитоскелета клетки, уровень цитокинов и нарушает клеточный цикл [12]. Кроме того, *H. pylori* синтезирует еще один бактериальный белок Vac А, который при поступлении в клетку хозяина нарушает процесс эндоцитоза, что приводит к формированию в цитоплазме крупных эндосомальных мультивезикулярных вакуолей [2]. По мнению других исследователей проникновение бактерий в эпителиальную клетку реализуется через сигнальные системы с включением фосфорилирования тирозина [10, 12]. Несмотря на неоднозначное отношение к молекулярным механизмам интернализации *H. pylori* в цитоплазму эпителия желудка, физиологический смысл этого феномена всеми исследователями признается однозначно – выживание бактерий под влиянием неблагоприятных факторов. Экспериментальными исследованиями показано, что ряд антибиотиков, включая гентамицин, не способен проникать через мембрану клеток эукариот, поэтому нахождение бактерии внутри клетки, либо



встраивание возбудителя в мембрану эпителиоцита может обеспечить толерантность *H. pylori* к антибиотику [5]. Более того, проникая в эпителий желудка, бактерии создают в цитоплазматических вакуолях слабо кислую среду, что позволяет сохранять их подвижность и способность к репликации [3].

После курса антихеликобактерной терапии, при исследовании полутонких срезов в световом микроскопе, в эпителии на всем протяжении желез определялся висмут-положительный материал в виде мелкозернистых и крупнолыбчатых включений. Инфильтрация стромы и собственной пластинки лейкоцитами существенно не отличалась от таковой на первичных биопсиях желудка больных. Висмут-положительный материал выявлялся как в строме желез, располагаясь по ходу ретикулиновых и коллагеновых волокон, так и в цитоплазме моноцитов/макрофагов инфильтрата собственной пластинки (Рис. 3 а, цв. вкладка 4).

На светооптическом уровне наличие *H. pylori* в слое слизи, на поверхности эпителия и в просвете желез не выявлено. Учитывая возможность интернализации бактерий и их внутриклеточного переживания, нами проанализированы ультраструктурные особенности эпителия желудка больных атрофическим гастритом после эрадикационной терапии. Ультраструктурно вегетативные формы бактерий на поверхности эпителиоцитов находятся на различных стадиях деградации и некроза (Рис. 3 б).

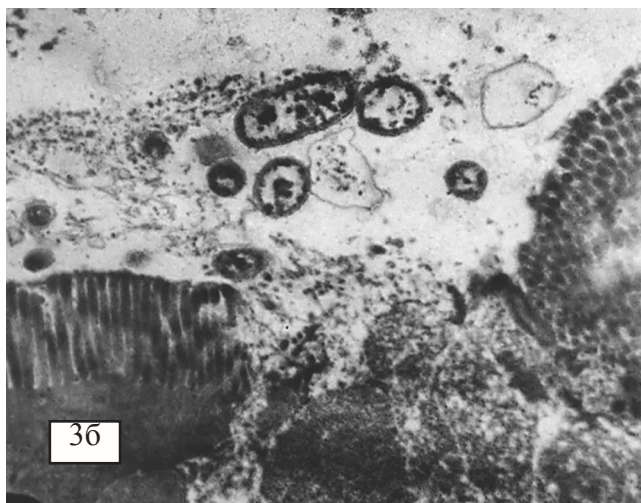


Рис. 3. Б – *H. pylori* на поверхности париетальной клетки на различных стадиях деградации. Частичное восстановление микроворсинок на поверхности плазмалеммы эпителиоцита. Реакция по Хаугу. ТЭМ. X12000.

Гибель *H. pylori* сопровождается восстановлением микроворсинок на поверхности плазмалеммы париетальных клеток (Рис. 4).

В цитоплазме этих клеток определяются довольно крупные вакуоли, содержащие висмут-положительный материал и кокковые формы бактерий, находящиеся в состоянии деградации. Погибшие бактерии сецернируются эпителиоцитами в просвет желез.

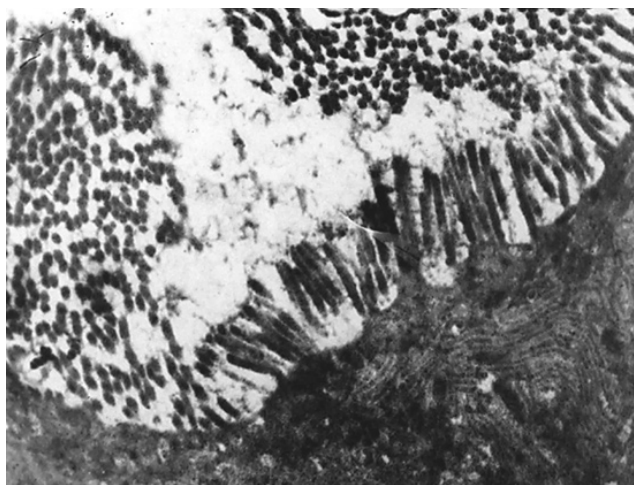


Рис. 4 Электроннограмма гистобиоптата больного с хроническим атрофическим гастритом после эрадикационной терапии. Полное восстановление микроворсинок на поверхности плазмалеммы париетальной клетки, отсутствие вакуолей, содержащих кокковые формы *H. Pylori*. Электронно-гистохимическая реакция по Хаугу. ТЭМ. X12000.

#### Заключение

Сравнительный морфологический и ультраструктурный анализ гистобиопсий слизистой оболочки антрального отдела желудка больных с атрофическим гастритом выявил высокую обсемененность эпителия *H. pylori*. Вегетативные и кокковые формы бактерий располагались как на поверхности, так и внутри цитоплазмы париетальных клеток.

Электронно-гистохимический анализ повторных биопсий, после курса эрадикационной терапии с использованием препарата «Де-нол» выявил наличие солей висмута в эпителии, собственной пластинке, строме желез, а также в моноцитах/макрофагах клеточного инфильтрата. Высокая пенетрантность препарата «Де-нол» обеспечила полную эрадикацию слизистой оболочки желудка, включая и внутриклеточные бактерии.

Таким образом, предложенный электронно-гистохимический подход в исследовании может служить объективным методом оценки эффективности антихеликобактерной терапии у больных хроническим атрофическим гастритом, ассоциированным с *H. pylori*.

#### Литература

1. Аруин Л.И., Кануллер Л.Л., Исаков В.А. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника / Триада X.- Москва.-1998.- 483 с.
2. Montecucco C., De Bernard M., Papini E., Zoratti, M. Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin: cell intoxication and anion-specific channel activity. //Current Topics Microbiol Immunol.-2001.-vol. 257.- P.113-129.
3. Amieva M. R., Salama N. R., Tompkins L. S., Falkow S. Helicobacter pylori enter and survive within multivesicular vacuoles of epithelial cells.// Cell. Microbiology.- 2002.- vol. 4.- P. 677-680.
4. Figueroa-Arredondo P., Heuser J.E., Akopyants N.S., Morisaki J.H., Giono-Cerezo S., Enriquez-Rincon F., Berg D.E. Cell vacuolation caused by Vibrio cholerae hemolysin. //Infect. Immun.-2001.- vol. 69.- P. 1613-1624.

5. *Corthesy-Theulaz, I., Porta, N., Pringault, E., Racine, L., Bogdanova, A., Kraehenbuhl, J.P. et al.* Adhesion of *Helicobacter pylori* to polarized T84 human intestinal cell monolayers is pH dependent. // *Infect Immun.*-1996.-v. 64,-p. 3827-3832.
6. *Denzer, K., Kleijmeer, M.J., Heijnen, H.F., Stoorvogel, W., and Geuze, H.J.* Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device.// *J. Cell Sci.*-2000.-v.113.-p. 3365-3374.
7. *Malfertheiner P., Megraud F, O'Morain C.* erent concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection -The Maastricht III Consent Report.// *Gut* – 2007. – v. 56. - P. 772-781.
8. *Chey W.D., Wong B.C.Y.* American College of gastroenterology Guideline on the Managemer *Helicobacter pylori* Infection. *Am. J Gastroenterol.*//2007 – v. 102. P. 1808 – 1825.
9. *Гайер Г.* Электронная гистохимия/ Мир. – Москва.- 1974.- 488 с.
10. *Apparicio S. R., Marsden R.* A rapid metilene Blue basic fuchsin stain for semi-thin sections of peripheral nerve and other tissues // *J. Microsc. (Eng.).* -1969.- Vol. 89. - p. 139 - 141.
11. *Kwok, T., Backert, S., Schwarz, H., Berger, J., and Meyer, T.F.* Specific entry of *Helicobacter pylori* into cultured gastric epithelial cells via a zipper-like mechanism. // *Infect Immun.*-2002.- v.70.- p. 2108-2120.
12. *Su, B., Johansson, S., Fallman, M., Patarroyo, M., Granstrom, M., and Normark, S.* Signal transduction-mediated adherence and entry of *Helicobacter pylori* into cultured cells. // *Gastroenterology* .-1999.-v.117.-p. 595-604
13. *Peek, R.M. Jr; Blaser, M.J., Mays, D.J., Forsyth, M.H., Cover, T.L., Song, S.Y. et al.* *Helicobacter pylori* strain-specific genotypes and modulation of the gastric epithelial cell cycle. // *Cancer Res.*-1999.-v.59.-p. 6124-6131.

**Сведения об авторах:**

Кондаков Игорь Константинович – зав. лабораторией экспериментальной и клинической морфологии Института терапии имени Л.Т.Малой АМН Украины. Пер. Титаренковский 28, кв.42, м. Харьков, 61039 Тел. 373-90-94, 719-77-09

Гальчинская Валентина Юрьевна – ст. научный сотрудник экспериментальной и клинической морфологии Института терапии имени Л.Т.Малой АМН Украины. Пр. Победы, 61, кв.328, м. Харьков, 61174 Тел. 373-90-94 р., 337-29-35 д.

Шитова Анна Борисовна – научный сотрудник лаборатории экспериментальной и клинической морфологии Института терапии имени Л.Т.Малой АМН Украины. Тел. р. 373-90-94