

УДК: 616.33-002.2-076.5

## ЦИТОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА МУКОЗНОЙ МИКРОФЛОРЫ ЖЕЛУДКА КАК ЭЛЕМЕНТ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ГАСТРИТЕ

© 2019 г. Дубенская Л. И., Баженов С. М., Шистерова О. А.

*Исследовались биопсии антрума и тела 42 больных хроническим гастритом. Применялись гистологические и цитологические методы. С каждого биопсийного образца изготавливали двухкомпонентные цитопрепараты «капля»- «отпечаток». Количество бактерий фона «капли» коррелировало с клиническими и гистологическими данными. Наибольшие скопления *Helicobacter pylori* главным образом локализируются во внутреннем слое слизи и ее вышерасположенных вязких волокнах. Нехеликобактерная микрофлора колонизирует и формирует микроколонии преимущественно во внешнем слое слизи.*

**Ключевые слова:** хронический гастрит, цитопрепараты слизистой оболочки желудка, нехеликобактерная микрофлора.

### ВВЕДЕНИЕ

Выявление и оценка мукозной микрофлоры слизистой оболочки желудка приобретает большое значение в диагностике и динамическом наблюдении при хроническом гастрите: полагают, что она участвует в развитии хронического гастрита, помимо *Helicobacter pylori* (HP) [3], а изменения микробного пейзажа при обострении его укладываются в дисбактериоз с избыточным ростом микрофлоры [2], распространение атрофического процесса в слизистой оболочке желудка сопровождается усилением дисбиотических изменений [1], поддерживающих воспаление. Немногочисленное в норме микробное сообщество слизистой желудка, тем не менее, обладает широким разнообразием [5].

Количественный микроскопический анализ состава оседлых микробных сообществ мукозной пристеночной микрофлоры желудочно-кишечного тракта требует применения специальных методов, которые не используются в повседневной практике. Необходимы доступные и простые, не столь точные, но соответствующие диагностическим целям качественные и количественные показатели мукозной микрофлоры, которые можно получить в ходе обычного гистологического и цитологического исследования, без гомогенизации материала: значение могут иметь размер, форма, структура, характер расположения оседлых микробных сообществ. Указанные особенности остаются малоизученными как в гистологическом, так и в параллельном цитологическом материале.

Доступность, дешевизна, быстрота и достаточная точность обеспечивают повсеместное применение обычных цитологических методов для выявления инфекционных патогенов на поверхности слизистых оболочек. Известно, что пристеночная слизь сохраняется в цитопрепаратах в наиболее полном объеме, тогда как в ходе гистологической обработки биоптатов она значительно утрачивается, а так же сильно сжимается вследствие обезвоживания. Для оценки мукозной микрофлоры желудка предпочтительна биоптат-сохраняющая технология: после изготовления цитопрепарата кусочек ткани поступает в стандартную гистологическую обработку с заливкой в парафин, это позволяет не только сохранить для исследования дополнительный биоптат, но и достичь точного топического соответствия цитологического и гистологического материала. Относительным недостатком методов прямой микроскопии является невозможность выявить микроорганизмы, количество которых в материале меньше нижней границы выявляемости (около  $3 \times 10^3$  клеток/мл, по данным R. Gmur, 1995). Использование традиционных общепринятых окрасок позволяет говорить только о морфологическом сходстве выявленного микроорганизма и предполагаемого с хорошо известной морфологией, то есть о выявлении морфотипов некоторых видов микроорганизмов. Однако, исследование мазков с гастробиоптатов – один из самых точных методов диагностики НР при наличии качественного биоптата, средней и значительной бактериальной колонизации [10].

Как показывает наш опыт, цитопрепараты слизистой желудка при хроническом гастрите содержат мукозную нехеликобактерную микрофлору (НХМФ), колонизирующую слизь в различных количествах, от единичных бактериальных клеток в поле зрения до массивной колонизации многими сотнями, плотных густых скоплений, имеющих вид моно- и мультивидовых микроколоний различных размеров. Точный визуальный подсчет количеств бактерий в участках их плотных скоплений невозможен. Тем не менее, необходим ориентировочный «подсчитываемый» показатель количеств НХМФ в однотипных компонентах цитопрепаратов разных больных. В целях сохранения естественного взаиморасположения элементов желателен не гомогенизировать материал.

Компонент цитопрепарата, пригодный для прямого счета бактерий НХМФ под микроскопом, должен соответствовать ряду условий: цельность его существенно не нарушается при изготовлении отпечатка. Бактерии, естественно, располагаются преимущественно отдельно, хорошо видны, представлены всеми имеющимися в препарате морфотипами. Имеется ряд участков с примерно одинаковым (для данного препарата) максимальным количеством НХМФ, подлежащим визуальному подсчету на единицу площади препарата.

Целью работы явилось:

1. Определение компонента цитопрепарата слизистой желудка, пригодного для прямого подсчета количества отдельно расположенных клеток НХМФ.
2. Учет данного показателя и анализ его в комплексе других, морфологических и клинических показателей больных хроническим гастритом.
3. Выявление ориентировочных визуальных микроскопических особенностей слизи, располагавшейся на различной глубине слизистого слоя.
4. Определение особенностей расположения НХМФ и НР в разных слизь-содержащих компонентах цитопрепаратов слизистой желудка.

## МЕТОД И МАТЕРИАЛЫ

Исследовались 42 больных хроническим гастритом обоего пола, возрастом от 21 до 66 лет, до лечения. С нативных биопсийных кусочков антрального и фундального отделов изготавливались двухкомпонентные цитопрепараты «капля»- «отпечаток»: в ходе ФГС свежезабранный гастробиопсийный кусочек помещался на предметное стекло, слизисто-белковая жидкость (СБЖ), ассоциированная с кусочком, быстро стекала с него, формируя «каплю». Затем биоптат сдвигался в сторону по длине стекла на 1,5-2 (см) и круговыми движениями изготавливался «отпечаток», содержащий преимущественно клеточный материал. Далее гастробиоптат помещался в 4-% нейтральный формалин для фиксации и последующей парафиновой заливки. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, красителем Романовского. Оценивали выраженность, активность воспаления, атрофии, кишечной метаплазии по Сиднейской системе (Хьюстонская модификация), количество НР. Учитывалась длительность заболевания, наличие дуоденогастрального рефлюкса, аллергии. Цитопрепараты окрашивали красителем Романовского, исследовали при увеличении  $\times 945$  (масляная иммерсия), микроскоп «БИОЛАМ», бинокулярная насадка АУ-12 («ЛОМО»). По всему препарату в целом (по «отпечатку» и «капле») полуколичественно оценивали ряд показателей: 1. НР, от 1 до 3 баллов общепринятым способом, 4 балла при наличии нескольких сотен хеликобактерий в поле зрения. 2. Максимальное количество НХМФ – НХМФ<sub>макс</sub>, от 0 до 5 баллов. 3. Путем прямого подсчета определяли максимальное количество бактериальных клеток НХМФ «капли» – НХМФ-К и палочек среди них – Пал-К. Для этого в окрашенной «капле», избегая краев, выбирали ряд участков фона с наибольшими количествами хорошо различимых, отдельно расположенных бактерий НХМФ, абсолютное количество которых подсчитывали визуально, в 5-10 полях зрения.

Цитопрепараты заметно отличались по количеству НХМФ в «капле», в зависимости от этого больные были разделены на две группы. Так, у 22 больных НХМФ-К было от 20 бактерий на поле зрения и более (1 группа), у

20 – менее, что визуально воспринималось как очень малое, поэтому показатели НХМФ-К и Пал-К у них не подсчитывались (2 группа). 1 и 2 группа не отличались по возрасту, наличию аллергии и дуоденогастрального рефлюкса. Статистическая обработка данных проводилась с помощью методов непараметрической статистики. Количественные признаки описывались медианой и интерквартильным размахом. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимали равным 0,05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Защитный слизистый слой покрывает люминальную поверхность на протяжении всего желудочно-кишечного тракта. Слизистый гель двухслойен, в нем имеется внутренний, наиболее вязкий, плотно присоединенный к поверхности эпителия слой («firmly adherent») и поверхностный, обращенный в просвет, менее вязкий, рыхлый и легко смещаемый («loosely adherent») слой [4]. Показано, что в толстом кишечнике в норме внутренний слой свободен от бактерий, они присутствуют только во внешнем слое, рыхлая, сетчатая структура которого и наличие важных жизненных ресурсов способствуют этому [6] – так формируется уникальная толстокишечная микробная ниша [8]. В желудке внутренний слой слизи проницаем для НР [9]. Учитывая принципиальную универсальность двухслойной структуры слизистого геля желудочно-кишечного тракта, можно предположить, что поверхностные дезорганизованные слои желудочной слизи, люминальные отделы которой постепенно растворяются в желудочном соке, могут заселяться НХМФ, основными источниками которой, очевидно, являются вышележащие отделы пищеварительного и респираторного трактов, микрофлора пищи.

Микроскопический вид слизи и ее количество в цитопрепаратах может значительно различаться. Визуальное различие слизи разной глубины расположения и плотности не всегда возможно и потому достаточно условно, наслоение разных уровней слизи неизбежно. Тем не менее, при оптимальном количестве слизи различных уровней, наиболее глубокая (аналог “firmly adherent”) может соответствовать оптически плотной, стекловидной слизи, покрывающей апикальную поверхность эпителия и ассоциированной с тканевыми клочками, клеточными комплексами. Часто выявляется слизь вышерасположенная, смещаемая, но не утратившая определенную вязкость и стекловидность, благодаря чему она различается в виде хорошо очерченных скоплений, волокон различных размеров и толщины, содержащих клетки эпителия в разных количествах или бесклеточных (аналог “loosely adherent”). Наиболее поверхностным, люминальным отделам слизи, деградированной и частично растворенной в желудочном соке, в значительной мере соответствует пленка СБЖ, которая составляет фон цитопрепарата и покрывает все

его элементы. Стекая с гастробиоптата на предметное стекло, СБЖ формирует «каплю», представляющую, на наш взгляд, преимущественно просветную жидкую слизь. Количество и соотношение слизи различной вязкости варьирует между биоптатами примерно одинаковых размеров. Причины этой вариабельности не ясны, нельзя исключить как естественный, так и технический их характер.

Наибольшие скопления (3-4 балла) типичных спиралевидных морфотипов НР выявлялись в плотной стекловидной слизи, ассоциированной с эпителиальными комплексами, в отдельно расположенных сгустках, как правило, ориентированно по ходу волокон, в меньших количествах – рассеянно в фоне цитопрепаратов. В редких полях зрения у отдельных больных НР выявлялись на фоне цитоплазмы раздельно расположенных эпителиальных клеток. В целом, цитологическим методом НР выявлен у 6 из 22 больных 1 группы, у 10 из 20 – 2 группы (различия не значимы). В обеих группах не выявлено значимых отличий в количествах НР антрального и фундального отделов, между группами так же не было различий.

Количество НХМФ макс значимо выше у больных 1 группы. Медиана показателя максимального количества НХМФ макс в антруме больных 1 группы составила 4,0 балла (интерквартильный размах 3,0-5,0), 2 группы – 2,0 балла (1,0-3,0),  $p=0,0008$ . В фундальном отделе данный показатель больных 1 группы – 4,0 балла (3,0-5,0), 2 группы – 2,5 балла (2,0-4,0),  $p=0,007$ . Выявлялись кокки разной величины, рассеянные и в скоплениях, парные, в виде коротких и длинных цепочек. Имелись прямые палочки разной длины и толщины, от мелких кокко-бактерий до крупных бацилл, тонкие нитчатые, морфотипы фузобактерий, вибрионов, ветвящихся палочек. В целом, преобладали кокки мелких и средних размеров.

Количество НХМФ значительно варьировало между цитопрепаратами разных больных. В пределах одного препарата возможна вариабельность от 0 и единичных бактериальных клеток до многих сотен на поле зрения, расположенных как рассеянно, так и в виде компактных микроколоний. Форма и размеры отдельно лежащих бактерий были лучше различимы в пленке СБЖ фона, наибольшие скопления и микроколонии чаще выявлялись на фрагментах из частично деструктурированной слизи, нередко со слущенным эпителием, имеющим вид детрита, что указывает на их расположение в поверхностных, люминальных отделах слизистого слоя. В скоплениях и отдельно лежащих волокнах слизи нередко выявлялось различное количество ориентированных по ходу волокон бактерий НХМФ: структурированное расположение может косвенно подтверждать не случайный характер ассоциации слизи и микроорганизмов, которые могут не только непосредственно присоединяться в муцинам кишечной стенки, но и формировать там микроколонии, биопленки [11].

Морфотипы НХМФ иногда выявлялись в слизи крупных эпителиальных комплексов, что можно связать скорее с сохранением более поверхностных уровней слизи в таких участках, чем с реальной колонизацией глубоких отделов: в большинстве остальных участков этих препаратов, в плотной стекловидной слизи бактерии НХМФ либо совсем не выявлялись, либо имелись единичные, не зависимо от наличия НР. Особенности расположения скоплений НР и НХМФ в цитопрепаратах подтверждают, что наиболее предпочтительной для НР зоной колонизации является плотная, вязкая слизь с ее глубокими отделами; для НХМФ характерна колонизация близкой к просвету поверхностной, рыхлой слизи.

Колонизация НХМФ поверхностных уровней слизи свойственна сохранной двухслойной слизи ЖКТ [6]. Внутренний слой действует как физиологический барьер, он становится проницаемым в экспериментальных моделях колита и у больных с язвенным колитом [7]. Поэтому можно предположить, что убедительное наличие скоплений НХМФ в глубокой слизи цитопрепаратов слизистой желудка - свидетельство грубых нарушениях защитных свойств мукозного барьера.

В отличие от НХМФ, хеликобактериям доступны все уровни слизистого слоя. НР выявлялись и в фоне, среди морфотипов НХМФ, вблизи от их скоплений. В антруме больных обеих групп выявлены прямые взаимосвязи между количественными показателями НР и НХМФ. Так, в 1 группе количество НР (гистологические срезы) коррелировало с НХМФ-К и Пал-К ( $r=0,612$ ,  $p=0,02$ ), в 2 группе показатель НХМФ<sub>макс</sub> взаимосвязан с количествами НР и в гистологических срезах ( $r=0,687$ ,  $p=0,03$ ), и в цитопрепаратах ( $r=0,768$ ,  $p=0,03$ ).

В фоне цитопрепаратов, в пленке СБЖ, нередко выявлялись участки с заметными количествами раздельно лежащих бактерий НХМФ, доступных для подсчета. Медиана количества бактериальных клеток НХМФ «капли» – НХМФ-К в антруме составила 83,0 бактерии на поле зрения (60,0-144,0), в фундальном отделе – 138,0 (80,0-186,0),  $p=0,02$ . Соответствующие показатели палочек Пал-К: 12,0 (8,0-16,0) и 17,0 (10,0-28,0),  $p=0,03$ . НХМФ-К и Пал-К прямо взаимосвязаны ( $r=0,869$ ,  $p=0,001$ ) в фундальном отделе.

Медиана длительности заболевания значимо больше в 1 группе – 8,5 лет (6,0-11,0), по сравнению со второй – 3,5 года (0,5-7,0),  $p=0,02$ . У больных 1 группы длительность заболевания прямо взаимосвязана с НХМФ-К ( $r=0,512$ ,  $p=0,03$ ), и Пал-К ( $r=0,489$ ,  $p=0,02$ ) в фундальном отделе. Наличие аллергии взаимосвязано с Пал-К антрума ( $r=0,724$ ,  $p=0,02$ ).

Активность, выраженность воспаления, атрофии слизистой оболочки желудка значимо не отличались у больных 1 и 2 групп. Однако в 1 группе НХМФ-К и Пал-К в антруме прямо взаимосвязаны с активностью, выраженностью воспаления ( $r=0,495$ ,  $p=0,04$ ), что не противоречит участию мукозной

микрофлоры в развитии хронического гастрита [3]. У больных 2 группы показатели НХМФ не коррелировали с показателями воспаления слизистой желудка.

## ВЫВОДЫ

1. Наиболее удобным для прямого визуального подсчета отдельно расположенных бактерий нехеликобактерной микрофлоры является компонент цитопрепарата – «капля».
2. Показатели нехеликобактерной микрофлоры «капли» были взаимосвязаны как с морфологическими, так и клиническими данными исследованных больных хроническим гастритом, что позволяет применять эти показатели в комплексной морфологической оценке слизистой желудка.
3. В цитопрепаратах хеликобактерии выявлялись во всех слизьсодержащих компонентах с преобладанием в оптически плотной слизи, нехеликобактерная микрофлора - в комплексах деструктурированной слизи, слизисто-белковой жидкости фона препаратов.
4. Условным аналогом глубокого (“firmly adherent”) слоя слизи может служить оптически плотная, стекловидная слизь, ассоциированная с апикальной поверхностью эпителиальных комплексов. Аналог поверхностного (“loosely adherent”) – отдельные волокна и скопления слизи, сохраняющей определенную визуальную плотность и различные границы, содержащие (или не содержащие) разные количества клеток слизистой оболочки желудка. Наиболее поверхностную слизь, частично растворенную в желудочном соке, очевидно, содержит слизисто-белковая жидкость фона цитопрепаратов и компонент «капля».

## ЛИТЕРАТУРА

1. Матвеева Л. В., Капкаева Р. Х., Мосина Л. М., Курусин В. М. Изменения пристеночной микробиоты желудка в зависимости от стадии атрофии слизистой оболочки на фоне активного воспалительного процесса // Медицинский альманах. 2016. Т.1. № 4. С. 44-47 [Matveeva L. V., Kapkaeva R. Kh., Mosina L. M., Kurusin V. M. Changes of parietal microbiota of the stomach depending on the stage of atrophy of the mucous membrane against the background of active inflammatory process // Meditsinskij al'manah. 2016. V.1. № 4. P. 44-47 (In Russ)].
2. Чернин В. В., Бондаренко В. М., Червинец В. М., Базлов С. Н. Дисбактериоз мукозной микрофлоры эзофагогастродуоденальной зоны. М.:

- ООО «Медицинское информационное агентство, 2011. 144 с.[Chernin V. V., Bondarenko V. M., Bazlov S. N. Dysbacteriosis of the mucosal microflora of the esophagogastrroduodenal zone. M.: “Medical Information Agency” Ltd., 2011. 144 p. (In Russ)].
3. Циммерман Я. С., Захарова Ю. А. Проблемные вопросы учения о хроническом гастрите // Клиническая медицина. 2017. Т.95. №1. С. 8-14. [Tsimmerman Ya.S., Zakharova Yu.A. Topical problems of chronic gastritis // Klinicheskaya meditsina. 2017. V.95. №1. P. 8-14.
  4. Atuma C., Strugala V., Allen A., Holm L. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo // Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2001; 280: 922-929.
  5. Dong Q., Xin Y., Wang L., Meng X. et al. Characterization of gastric microbiota in twins // Curr Microbiol 2017; 74(2): 224-229.
  6. Johansson M. E. V., Karsson J. M. H., Hansson G. C. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions // PNAS. 2011; 108:4659-4665.
  7. Johansson M. E. Mucus layers in inflammatory bowel diseases // Inflamm Bowel Dis 2014; 20(11):2124-2131.
  8. Li H., Limenitakis J. P., Fuhrer T., Geuking M. B., et al. The outer mucus layer hosts a distinct intestinal microbial niche // Nat Commun, 2015; 6: 8292.
  9. Sekine M., Kobayashi D., Ito T., Uchida K., et al. Immunohistochemical detection of *Helicobacter pylori* with a novel monoclonal antibody: its clinicopathological significance and validity in the routine pathological diagnosis // Rinsho Byori 2012; 60(4): 287-293.
  10. Siavoshi F., Saniee P., Khalili-Samani S., Hosseni F. et al. Evaluation of methods for *H.pylori* detection in PPI consumption using culture, rapid urease test and smear examination // Ann Transl Med 2015; 3(1): 11.
  11. Sicard J.-F., Le Bichan G., Vogeleer P., Jacques M. et al. Interactions of intestinal bacteria with components of the intestinal mucus // Front Cell Infect Microbiol 2017; 7: 387.

## **CYTOLOGICAL VALUATION OF GASTRIC MUCOUS MICROFLORA AS ELEMENT OF MORPHOLOGICAL RESEARCH IN CHRONIC GASTRITIS**

**Dubenskaya L. I., Bazhenov S. M., Shisterova O. A.**

We examined gastric biopsy of antrum and body from 42 patients with chronic gastritis. Histological and cytological methods were used. From each gastric biopsy specimen two- component cytosmeared “drop”- “imprint” were prepared. Bacterial count in background of “drop” correlated with both clinical and histolog-

ical data. Most large accumulations of *Helicobacter pylori* mainly locate in inner mucus layer and higher disposed viscous mucus fibers. Nonhelicobacter microflora preferentially colonizes and form microcolonies within outer mucus layer.

**Key words:** chronic gastritis, cytosmears of gastric mucosa membrane, non-helicobacter microflora.

**Дубенская Людмила Игоревна** – к.м.н., старший научный сотрудник отдела патоморфологии Научно-исследовательского центра ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава России. E-mail: [dubenskaya-l@list.ru](mailto:dubenskaya-l@list.ru) .

**Баженов Сергей Михайлович** – к.м.н., старший научный сотрудник, заведующий отделом патоморфологии Научно-исследовательского центра ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава России. E-mail: [smbazhenov@mail.ru](mailto:smbazhenov@mail.ru) .

**Шистерова Оксана Александровна** – к.м.н., врач-патологоанатом высшей категории, заведующая патологоанатомическим отделением ОГБУЗ «Смоленский областной онкологический клинический диспансер».

Научно-исследовательский центр  
ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет»  
Минздрава России  
г. Смоленск  
Science-Research Center  
Smolensk State Medical University.  
Поступила в редакцию 26.11.2019.