

## МУКОЦИТЫ С МИКРОЯДРАМИ И ОБСЕМЕНЕННОСТЬ КОККОВЫМИ ФОРМАМИ *HELICOBACTER PYLORI* В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ЖЕЛУДКА ЧЕЛОВЕКА

© Л. В. Китаева,<sup>1</sup> И. А. Михайлова,<sup>2</sup> Д. М. Семов,<sup>2</sup> С. Н. Прошин,<sup>2</sup> В. Ю. Кравцов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Государственная медицинская академия им. И. И. Мечникова и

<sup>2</sup> Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А. М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург;

<sup>1</sup> электронный адрес: kitaevsfamily@mail.ru

По решению Международного агентства по изучению рака *Helicobacter pylori* отнесен к канцерогенам первой группы. Поскольку считается, что канцерогенные факторы обладают мутагенным эффектом, мы провели цитогенетическое обследование 62 пациентов с хроническим неатрофическим гастритом (40 из которых имели *H. pylori*-ассоциированный гастрит) методом учета микроядер в мукоцитах покровно-язочного эпителия слизистой оболочки антрального отдела желудка. Выявление бактериальных клеток *H. pylori* в слизистой оболочке желудка (СОЖ) осуществляли с помощью иммуноцитохимического метода, позволяющего визуализировать бациллярные и кокковые формы, а также оценивать степень обсемененности СОЖ кокковыми формами *H. pylori*. В группе пациентов с *H. pylori*-ассоциированными гастритами частота встречаемости мукоцитов с микроядрами в СОЖ оказалась достоверно большей, чем в группе пациентов, СОЖ которых не была инфицирована *H. pylori* ( $P < 0.05$ ). Высокая степень обсемененности кокковыми формами *H. pylori* сопровождалась значимо повышенным уровнем мукоцитов с микроядрами в СОЖ. В связи с этим и на основе современных представлений о канцерогенезе, в основе которых лежат мутагенные изменения в соматических клетках, пациенты с высокой обсемененностью кокковыми формами *H. pylori* могут быть отнесены к группе повышенного онкологического риска.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*, микроядра, покровно-язочный эпителий желудка.

Многочисленными исследованиями в последнее десятилетие доказано и общепризнана роль хеликобактерной инфекции в патогенезе хронического гастрита, язвенной болезни и рака желудка. Показано, что у пациентов, инфицированных *Helicobacter pylori*, рак желудка встречается в 4–6 раз чаще, чем у неинфицированных (IARC..., 1994; Аруин, 1997), а малигнизация чаще происходит в антральном отделе желудка (Kivilioto et al., 1993). Международное агентство по изучению рака (МАИР) признало достаточно доказательным отнести *H. pylori* к канцерогенам первой группы. Абсолютное большинство канцерогенов обладает мутагенным эффектом (Худолей, 1999). Мутагенный эффект в популяциях соматических клеток млекопитающих и человека установлен и для инфекционных агентов (в основном для вирусов и бактерий). Инфекционный мутагенез изучается на протяжении нескольких десятилетий (Ильинских и др., 1984, 2005), а в связи с актуальностью хеликобактериозов нестабильность генома исследуется и в клеточных популяциях мукоцитов слизистой оболочки желудка (СОЖ), поскольку при инфицировании *H. pylori* они непосредственно подвергаются его неблагоприятному воздействию (Arabski et al., 2005).

Одним из надежных методов выявления мутагенных факторов является микроядерный тест (Muller, Streffer, 1995). Микроядра образуются в процессе деления из хромосомного материала, потерявшего контакт с веретеном деления. Они включают в себя хроматин либо ацентрических фрагментов, либо целых хромосом (хроматид).

Частота встречаемости клеток с микроядрами свидетельствует 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 (Blakey et al., 1985; Migliore et al., 1989; Сычева и др., 2003).

Бактериальные клетки *H. pylori* существуют в двух вариантах — в виде спиралевидных форм («крыло чайки») и в виде кокковых форм (Janas et al., 1995; Saito et al., 2003; Willen et al., 2003). Кокковые формы *H. pylori* по сравнению со спиралевидными формами переносят более широкий диапазон pH (Nilsson et al., 2002) и более устойчивы к неблагоприятным факторам и антибиотикам (Axon, Moayyedi, 1996; Brenciaglia et al., 2000), при этом они не утрачивают вирулентность (Sisto et al., 2000; She et al., 2003). Превращение спиралевидных форм *H. pylori* в кокковые в СОЖ, возможно, так же как и в культуральной среде, обусловлено накоплением токсических продуктов их жизнедеятельности (Taneera et al., 2002). Трансформация *H. pylori* из спиралевидных форм в кокковые сопровождается изменениями в метаболизме липидного обмена *H. pylori* (Shimomura et al., 2004), а также может быть инициирована активными формами кислорода, генерируемыми самими бактериальными клетками *H. pylori* (Park et al., 2004). Последнее обстоятельство представляется особенно важным, поскольку активные формы кислорода, являясь мутагенным фактором, могут стать при-

чиной цитогенетической нестабильности мукоцитов СОЖ (Park et al., 2004; Arabski et al., 2005). Таким образом, вполне оправданным будет предположение о том, что обсемененность СОЖ бактериальными клетками *H. pylori* должна сопровождаться повышенной цитогенетической нестабильностью мукоцитов покровно-ямочного эпителия, а частота цитогенетических нарушений в клеточных популяциях мукоцитов может быть связана со степенью обсемененности СОЖ кокковыми формами *H. pylori*.

В настоящем сообщении мы приводим результаты изучения цитогенетической нестабильности в клеточных популяциях покровно-ямочного эпителия антрального отдела желудка у пациентов с диагнозом *H. pylori*-ассоциированный неатрофический гастрит, имеющих различную степень обсемененности кокковыми формами *H. pylori*. Изучение уровня цитогенетической нестабильности *H. pylori* в СОЖ осуществлялось с помощью иммуноцитохимического метода, позволяющего визуализировать кокковые формы, а также оценивать степень обсемененности СОЖ кокковыми формами *H. pylori*.

### Материал и методика

Исследование микроядерным методом в клеточных популяциях мукоцитов, а также иммуноцитохимическое исследование бактериальных клеток *H. pylori* было проведено в гастробиоптатах, полученных при эзофагогастродуоденофиброскопии с одновременной биопсией СОЖ от 40 пациентов с диагнозом хронический *H. pylori*-ассоциированный неатрофический гастрит и 22 пациентов с хроническим неатрофическим гастритом без инфицирования *H. pylori*. Важно отметить, что диагнозы были верифицированы морфологическим методом, а также и то обстоятельство, что все обследованные пациенты, судя по гистологическим заключениям, имели одинаковую слабую степень воспаления СОЖ. Возраст обследованных пациентов колебался от 20 до 48 лет и составил в среднем 37 лет. Метод инструментальной диагностики включал в себя обязательное выполнение эзофагогастродуоденофиброскопии с одновременной биопсией слизистой оболочки желудка. Эндоскопическое исследование выполняли по общепринятой методике, в процессе которой оценивали состояние слизистой оболочки: степень выраженности воспаления, гиперплазию складок и наличие атрофических изменений гастродуоденальной слизистой оболочки. Прицельную биопсию проводили из антрального отдела желудка. Биопсийный материал СОЖ использовали для проведения гистологических, иммуноцитохимических и рутинных цитологических исследований.

Для выявления спиралевидных и кокковых форм *H. pylori* использовали иммуноцитохимический метод. Биоптаты СОЖ, полученные при выполнении фиброэзофагогастродуоденоскопии с прицельной биопсией, отпечатывали на обезжиренные предметные стекла тонким слоем. Цитологические мазки, фиксированные смесью спирта с ацетоном (1 : 1) в течение 10 мин, высушивали на воздухе и инактивировали эндогенную пероксидазу в 1%-ном азиде натрия (Merck, Германия) в течение 30 мин. Промывали в двух сменах бидистиллированной воды и оставляли на 5 мин в Трис-NaCl (pH 7.6). До нанесения преиммунной свиной сыворотки (Novocastra, Франция) поле для иммуноцитохимического анализа локализовыва-

ли гидрофобным карандашом (DakoCytomation, Дания). По окончании инкубации с преиммунной сывороткой (30 мин при комнатной температуре) наносили поликлональные кроличьи антитела (NCL-HPr, Novocastra, Франция), направленные против антигенов клеточной стенки *H. pylori*, и инкубировали препараты в течение 1 ч при 37 °С. По завершении мечения первыми антителами препараты промывали в двух сменах буфера по 5 мин и нанесли биотинилированные антитела (DakoCytomation, Дания), направленные против кроличьих антител. Со вторыми антителами препараты инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Следующим этапом иммуноцитохимической процедуры, которому предшествовала отмывка препаратов в двух сменах буфера, являлось нанесение на 30 мин при комнатной температуре системы визуализации, состоящей из растворимого комплекса авидин—биотинилированная пероксидаза хрена (DakoCytomation, Дания). В качестве субстрата для проявления иммуноцитохимической реакции использовали 3,3'-diaminobenzidine (ДАБ) в формате от фирмы Novocastra (Франция). Для контрастирования препараты подкрашивали с использованием красителя ЦитоСтейн-ГК (Диахим, Абрис, Россия). Следует отметить, что при использовании в качестве первых антител поликлональных кроличьих результат иммуноцитохимической верификации *H. pylori*-инфекции полностью соответствовал результату, когда вариантом первых антител являлись поликлональные кроличьи антитела от фирмы Novocastra (Франция).

Количественную оценку кокковых форм *H. pylori* проводили по четырем следующим градациям, как это было описано нами ранее (Кравцов и др., 2006): 1) кокковые формы *H. pylori* не выявляются (не встречаются ни в одном из просмотренных полей зрения); 2) кокковые формы единичные (наблюдение, при котором бактериальная клетка-кокк обнаруживается в одном из пяти полей зрения, но не в каждом поле зрения); 3) кокковые формы *H. pylori* присутствуют (в каждом просмотренном поле зрения встречаются кокки *H. pylori*, и количество их не превышает 10 % от всех наблюдаемых форм *H. pylori* — спиралевидных и кокковых); 4) кокковые формы *H. pylori* обнаруживаются в значительном количестве (практически во всех полях зрения, и доля их превышает 10 % от всех форм *H. pylori* — спиралевидных и кокковых).

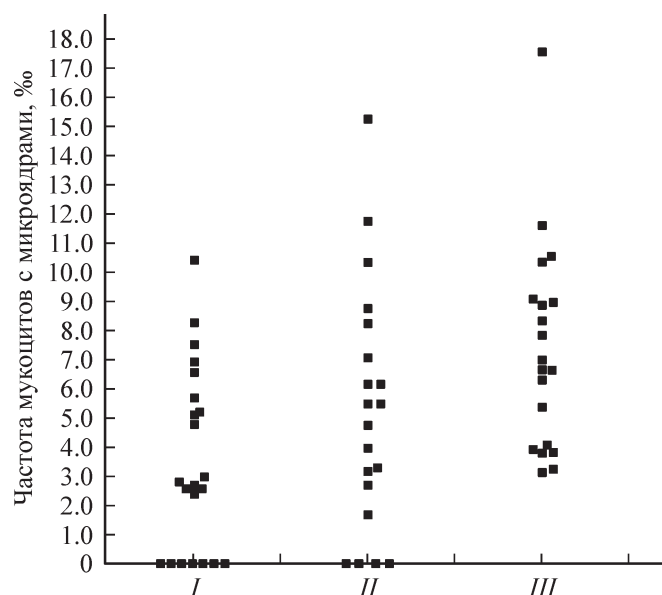
Исследование микроядер проводили ретроспективно. Для этого были отобраны и вновь использованы цитологические мазки-отпечатки от гастробиоптатов из антрального отдела желудка, полученные в период с 2000 по 2003 г. и предназначенные для рутинных цитологических исследований. Эти цитологические мазки-отпечатки высушивали на воздухе, фиксировали этанолом (96 %) в течение 5 мин и окрашивали азуром 2—эозином по Романовскому. От каждого пациента был получен один рутинно окрашенный цитологический препарат, в котором анализировали максимальное количество мукоцитов покровно-ямочного эпителия. В среднем у каждого пациента было исследовано 500 мукоцитов СОЖ. В показатель «клетки с микроядрами» включали мукоциты, используя следующие критерии: не допускалось наложения клеток друг на друга, основное ядро и микроядро были расположены в цитоплазме и находились в одном оптическом поле; характер окрашивания хроматина микроядер соответствовал или был чуть бледнее окраски основного ядра; микроядра имели округлую или овальную форму; границы микроядер четко очерчены и отделены от ядра клетки.

Частоты встречаемости мукоцитов с микроядрами в слизистой оболочке антрального отдела желудка мы определяли в следующих группах пациентов: первую группу составили 22 пациента с неатрофическим хроническим гастритом без инфицирования СОЖ бактериальными клетками *H. pylori*; вторую — 20 человек с *H. pylori*-ассоциированным неатрофическим хроническим гастритом, в СОЖ у которых были выявлены только спиралевидные формы *H. pylori*, а кокковых форм *H. pylori* не выявлено; третью — 20 человек с *H. pylori*-ассоциированным неатрофическим хроническим гастритом, в СОЖ у которых были выявлены и спиралевидные формы *H. pylori*, и в значительном количестве (более 10 %) кокковые формы *H. pylori*.

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

## Результаты и обсуждение

В мазках-отпечатках, полученных из гастробиоптатов СОЖ и окрашенных иммуноцитохимическим методом с проявкой диаминобензидином (ДАБ), бактериальные клетки *H. pylori* имели цвета от темно-коричневого до насыщенного черного (см. рисунок). Размеры спиралевидных форм бактериальных клеток *H. pylori* варьировали от 3—5 мкм в длину и составляли около 0.5 мкм в поперечнике. Кокковые формы *H. pylori* в абсолютном большинстве случаев имели размеры от 0.5 до 1.0 мкм в диаметре и идеально округлую форму. Иногда наряду с бактериальными клетками *H. pylori*, окрашенными ДАБ в коричнево-черный цвет, были видны бактериальные клетки (бациллы, палочки, диплококки и пр.), которые окрашивались в светлые серо-розовые тона гематоксилином.



Распределение пациентов с неатрофическим хроническим гастритом по показателю «частота встречаемости мукоцитов с микроядрами» в слизистой оболочке желудка.

I — 1-я группа, без инфицирования СОЖ бактериальными клетками *H. pylori*; II — 2-я группа, выявлены только спиралевидной формы *H. pylori*; III — 3-я группа, выявлены в значительном количестве спиралевидные и кокковые формы *H. pylori*.

Частота встречаемости мукоцитов с микроядрами в слизистой оболочке антрального отдела желудка у больных с неатрофическим хроническим гастритом

Группа пациентов	Количество человек	Проанализировано клеток	Мукоциты с микроядрами	
			количество	%, $\bar{x} \pm s_x$
1-я — спиралевидные <i>H. pylori</i> (–), кокки (–)	22	8884	33	$3.8 \pm 0.6$
2-я — спиралевидные <i>H. pylori</i> (+), кокки (–)	20	8263	39	$4.7 \pm 0.7$
3-я — спиралевидные <i>H. pylori</i> (+), кокки (+)	20	10 696	72	$6.7 \pm 0.8^a$

<sup>a</sup>  $P < 0.05$  по сравнению с 1-й группой пациентов.

Микроядра в мукоцитах покровно-язвенного эпителия СОЖ по цвету, хроматиновой зернистости и интенсивности окрашивания чаще всего соответствовали таковым ядер клеток, в которых они наблюдаются. Размеры микроядер, как правило, не превышали одной четверти площади ядра той же клетки, а абсолютные размеры (диаметры) микроядер в мукоцитах варьировали от 0.5 до 4.0 мкм. Форма микроядер в мукоцитах, как правило, круглая или овальная.

Распределение пациентов трех обследованных групп по показателю «частота встречаемости мукоцитов с микроядрами в СОЖ» представлена в таблице. В группе 1 (пациенты без инфицирования *H. pylori*) размах изменчивости по этому показателю составил от 0 до 10.4 %. Важно отметить, что именно в этой группе было наибольшее число пациентов, у которых микроядра не встретились. Напротив, в 3-й группе (с хроническим неатрофическим *H. pylori*-ассоциированным гастритом и кокковой обсемененностью бактериальными клетками *H. pylori*) у всех пациентов в гастробиоптатах были обнаружены мукоциты с микроядрами. В этой же группе была отмечена максимальная частота встречаемости мукоцитов с микроядрами, которая достигала 17.6 %. Группа 2 (хронический неатрофический *H. pylori*-ассоциированный гастрит без обсеменности кокковыми формами *H. pylori*) по характеру распределения занимала промежуточную позицию. *U*-критерий Вилкоксона—Манна—Уитни выявил достоверные различия между всеми обследованными группами ( $P < 0.05$ ).

Средняя частота мукоцитов СОЖ с микроядрами в группах пациентов с *H. pylori*-ассоциированным хроническим неатрофическим гастритом (40 человек, 2-я и 3-я группы) составила  $5.8 \pm 0.5 \%$  и оказалась достоверно выше таковой в группе пациентов с хроническим неатрофическим гастритом, не ассоциированным с *H. pylori* (1-я группа), у которых она составила  $3.8 \pm 0.6 \%$  ( $P < 0.05$ ). Средние частоты мукоцитов СОЖ с микроядрами, определенные в группах 1—3, приведены в таблице. Важно отметить, что наибольшая среднегрупповая частота встречаемости мукоцитов с микроядрами наблюдалась в группе 3 с высокой степенью обсеменности кокковыми формами *H. pylori* и достоверно отличалась от таковой группы 1 ( $P < 0.05$ ).

Таким образом, полученные данные позволяют сделать заключение о том, что обсемененность бактериальными клетками *H. pylori* и особенно кокковыми формами *H. pylori* сопровождается повышением частоты возникновения мукоцитов с цитогенетическими нарушениями (микроядрами) в СОЖ антрального отдела желудка.

Определение фоновой частоты мукоцитов с микроядрами в покровно-ямочном эпителии слизистой оболочки желудка у практически здоровых людей в нашем исследовании не представлялось возможным по объективным причинам. Процедура проведения эзофагогастроуденофиброскопии с одновременной биопсией слизистой оболочки желудка назначается по медицинским показаниям и, как правило, в тех случаях, когда больной обращается с жалобами. Несмотря на это, в мировой литературе имеются сведения о том, что спонтанный уровень клеток с микроядрами в популяциях соматических клетках человека *in vivo* и *in vitro* не превышает 3 на 1000 клеток (Нерсесян, 1996). По нашим данным, в клеточных популяциях мукоцитов, инфицированных бактериальными клетками *H. pylori*, частота клеток с микроядрами превышает 6 %.

Инфицирование *H. pylori* индуцирует повреждения ДНК, выявляемые с помощью метода ДНК-комет в культуре желудочных эпителиоцитов (Arabski et al., 2005). У пациентов с хроническим *H. pylori*-ассоциированным гастритом обнаружены изменения в экспрессии генов и повышенный уровень генных мутаций в эпителии СОЖ (Gologan et al., 2005). Экстракт, полученный из бактерии *H. pylori*, вызывает повышенный синтез ДНК, что является следствием репарации поврежденной ДНК. Предполагается, что активным компонентом экстракта выступает белок с характерной мол. массой 100 кДа (Obst et al., 2000). Возможно, указанные повреждения ДНК, индуцируемые *H. pylori* и нерепарированные, реализуются в структурные aberrации, которые регистрируются с помощью микроядерного теста. Следует также отметить, что гастриальные эпителиальные клетки, инфицированные *H. pylori*, более чувствительны к другим повреждающим агентам по сравнению с неинфицированными клетками (Arabski et al., 2005).

Известно, что воспалительный процесс любой этиологии сопровождается иммунной реакцией. При этом в очаге воспаления наблюдается усиление свободнорадикальных процессов, что ведет к повышению концентрации свободных радикалов и продуктов свободнорадикального окисления (супероксидного радикала  $O_2^{\cdot-}$ , гидроксильного радикала  $OH^{\cdot}$  и пероксинитрита  $ONOO^{\cdot-}$ ) (Владимиров, 1998). Хронический воспалительный процесс также сопровождается изменениями, ведущими к существенному уменьшению диффузии кислорода к клеткам эпителия, и усилению мутационного процесса в эпителиоцитах обусловлено, вероятно, снижением экспрессии генов репарации ДНК при гипоксии (Mikhailova et al., 2003). Установлено, что при инфицировании *H. pylori* уровень образования активных форм кислорода в слизистой оболочке желудка выше, чем при отсутствии *H. pylori*, даже при одинаковой инфильтрации ее нейтрофилами и макрофагами (Ивашкин и др., 2000). Мутагенные эффекты свободных радикалов кислорода могут быть скорректированы антиоксидантной системой. Однако длительная колонизация бактериальными клетками *H. pylori* значительно снижает концентрацию различных антиоксидантных соединений в желудке (Zhang, Farthing, 2000).

Наибольший уровень эпителиоцитов с микроядрами нами выявлен у пациентов 3-й группы по сравнению с больными 2-й группы ( $6.7 \pm 0.8$  и  $4.7 \pm 0.7$  % соответственно) и по сравнению с пациентами 1-й группы ( $6.7 \pm 0.8$  и  $3.8 \pm 0.6$  % соответственно,  $P < 0.05$ ), т. е. высокая степень обсемененности (+++) слизистой оболочки кокковыми формами, вероятно, усиливает генотоксическое действие бациллярных форм. Возможно, что повышенная цитогенетическая нестабильность мукоцитов, обсемененных кокковыми формами *H. pylori*, обусловлена усиленной иммуногенностью самих кокков *H. pylori*. Как известно, кокковые формы способны не только к адгезии с желудочным эпителием, но и к стимуляции эпителиоцитами интерлейкина-8 (Cole et al., 1997; Liu et al., 2006). С помощью иммуоферментного анализа было обнаружено четырехкратное усиление иммунного ответа на антигены кокковых форм по сравнению с таковыми бациллярных форм (Ng et al., 2003). По-видимому, превращение бациллярных форм в кокковые и вместе с тем повышение цитогенетической нестабильности сопряжены со свободнорадикальным окислением, в котором участвуют и сами бактерии *H. pylori* (Park et al., 2004), и клетки-иммунные эффекторы (Владимиров, 1998).

Таким образом, результаты настоящего цитогенетического обследования больных хроническим гастритом свидетельствуют о значительном влиянии *H. pylori* и продуктов его жизнедеятельности на генетические структуры мукоцитов покровно-ямочного эпителия слизистой оболочки желудка. Высокая степень обсемененности слизистой оболочки желудка кокковыми формами *H. pylori* сопровождается значимо повышенным уровнем мукоцитов с микроядрами. Согласно современным представлениям о канцерогенезе, в основе которого лежат мутагенные изменения в соматических клетках, пациенты с высокой кокковой обсемененностью могут быть отнесены к группе повышенного онкологического риска.

#### Список литературы

- Аруин Л. И. 1997. Инфекция *Helicobacter pylori* канцерогенна для человека. Арх. патол. 3 : 74—78.
- Владимиров Ю. А. 1998. Свободные радикалы и антиоксиданты. Вестн. РАМН. 7 : 43—51.
- Ивашкин В. Т., Иноземцев С. А., Прохорова Л. В. 2000. Свободнорадикальные окислительные процессы в слизистой оболочке желудка при хроническом хеликобактерном гастрите и раке желудка. Рос. журн. гастроэнтер. гепатол. колопроктол. 10 (5), прилож. 11 : 21.
- Ильинских Н. Н., Бочаров Е. Ф., Ильинских И. Н. 1984. Инфекционный мутагенез. Новосибирск: Наука. 167 с.
- Ильинских И. Н., Навицкий В. В., Ильинских Е. Н., Ильинских Н. Н., Ткаченко С. Б. 2005. Инфекционная карнопатология. Томск: Изд-во Томск. ун-та. 168 с.
- Кравцов В. Ю., Никифоров А. М., Прошин С. Н., Кондрашин А. С., Кобиашвили М. Г., Михайлова И. А. 2006. Иммуноцитохимическое исследование кокковых форм *Helicobacter pylori* в биоптатах слизистой оболочки желудка у больных хроническим гастритом. Клин. лабор. диагностика. 3 : 52—54.
- Нерсесян А. К. 1996. Микроядерный тест в эксфолиативных клетках человека как метод изучения действия мутагенов-канцерогенов. Цитология и генетика. 30 (5) : 91—96.
- Сычева Л. П., Журков В. С., Жолдакова З. И., Полякова Е. Е., Ахальцева Л. В., Неякина Е. В., Сеницына О. О. 2003. Оценка мутагенной активности бутилового спирта и продуктов его хлорирования. Токсикологич. вестн. 4 : 39—43.
- Худoley В. В. 1999. Канцерогены: Характеристики. Закономерности. Механизмы действия. СПб.: НИИ химии СПбГУ. 419 с.

- Arabski M., Klupinska G., Chojnacki J., Kazmierczak P., Wisniewska-Jarosinska M., Drzewoski J., Blasiak J. 2005. DNA damage and repair in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa cells. *Mutat. Res.* 570 : 129—135.
- Axon A. T., Moayyedi P. 1996. Eradication of *Helicobacter pylori*: omeprazole in combination with antibiotics. *Scand. J. Gastroenterol.* 215 : 82—89.
- Blakey D. H., Duncan A. M. V., Wargovich M. J., Goldberg M. T., Bruce W. R., Heddle J. A. 1985. Detection of nuclear anomalies in the colonic epithelium of the mouse. *Cancer Res.* 45 : 242—249.
- Brenciaglia M. I., Fornara A. M., Scaltrito M. M., Dubini F. 2000. *Helicobacter pylori*: cultivability and antibiotic susceptibility of coccoid forms. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 13 : 237—241.
- Cole S. P., Cirillo D., Karnoff M. F. 1997. Coccoid and spiral *Helicobacter pylori* differ in their abilities to adhere to gastric epithelial cells and induce interleukin-8 secretion. *Infect. Immun.* 65 : 843—846.
- Gologan A., Graham D. Y., Sepulveda A. R. 2005. Molecular markers in *Helicobacter pylori*-associated gastric carcinogenesis. *Clin. Lab. Med.* 25 : 197—222.
- IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 1994. Vol. 61. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. Lyon, France: International agency for research on cancer. 180 p.
- Janas B., Czkwianianc E., Bak-Romaniszyn L., Bartel H., Tosik D., Planeta-Malecka I. 1995. Electron microscopic study of association between coccoid forms of *Helicobacter pylori* and gastric epithelial cells. *Amer. J. Gastroenterol.* 90 : 1829—1833.
- Kivilioto T., Mustonen H., Kivilakso E. 1993. The defence mechanisms against intracellular acidosis in antrum and corpus mucosa. *Gastroenterology.* 104 : A119.
- Liu Z. F., Chen C. Y., Tang W., Zhang J. Y., Gong Y. Q., Jia J. H. 2006. Gene-expression profiles in gastric epithelial cells stimulated with spiral and coccoid *Helicobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.* 55 : 1009—1015.
- Migliore Z., Ventura Z., Barale R., Zoprieno N., Castellino S., Pubci R. 1989. Micronuclei and nuclear anomalies induced in the gastro-intestinal epithelial of rats treated with formaldehyde. *Mutagenesis.* 4 : 327—334.
- Mihaylova V. T., Bindra R. S., Yuan J. 2003. Decreased expression of the DNA mismatch repair Mlh1 under hypoxic stress in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 23 : 3265—3273.
- Muller W. U., Streffer C. 1995. Micronucleus assay. In: *Advances in mutagenesis research* 5. Berlin: Springer-Verlag. 1—108.
- Ng B. L., Quak S. H., Aw M., Goh K. T., Ho B. 2003. Immune responses to differentiated forms of *Helicobacter pylori* in children with epigastric pain. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10 : 866—869.
- Nilsson H. O., Blom J., Al-Sound W. A., Ljungh A., Andersen L. P., Wadstrom T. 2002. Effect of cold starvation, acid stress, and nutrients on metabolic activity of *Helicobacter pylori*. *Applied Environ. Microbiol.* 68 : 11—19.
- Obst B., Wagner S., Sewing K. F., Beil W. 2000. *Helicobacter pylori* causes DNA damage in gastric epithelial cells. *Carcinogenesis.* 21 : 1111—1115.
- Park A. M., Li Q., Nagata K., Tamura T., Shimono K., Sato E. F., Inoue M. 2004. Oxygen tension regulates reactive oxygen generation and mutation of *Helicobacter pylori*. *Free Radic Biol. Med.* 36 : 1126—1133.
- Saito N., Konishik K., Sato F. 2003. Plural transformation-processes from spiral to coccoid *Helicobacter pylori* and its viability. *J. Infect.* 46 : 49—55.
- She F. F., Lin J. Y., Lin J. Y., Huang C., Su D. H. 2003. Virulence of water-induced coccoid *Helicobacter pylori* and its experimental infection in mice. *World J. Gastroenterol.* 9 : 516—520.
- Shimomura H., Hayashi S., Yokota K., Oguma K., Hirai Y. 2004. Alteration in the composition of cholesteryl glucosides and other lipids in *Helicobacter pylori* undergoing morphological change from spiral to coccoid form. *FEMS Microbiol. Lett.* 237 : 407—413.
- Sisto F., Brenciaglia M. I., Scaltrito M. M., Dubini F. 2000. *Helicobacter pylori*: ureA, cagA and vacA expression during conversion to the coccoid form. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 15 : 277—282.
- Taneera J., Moran A. P., Hynes S. O., Nilsson H. O., Al-Soud W., Wadstrom T. 2002. Influence of activated charcoal, porcine gastric mucin and beta-cyclodextrin on the morphology and growth of intestinal and gastric *Helicobacter*. *Microbiology.* 148 : 677—684.
- Willen R., Carlen B., Wang X., Papadogiannakis N., Odselius R. 2003. Wadstrom morphologic conversion of *Helicobacter pylori* from spiral to coccoid form. Scanning (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) suggest viability. *World J. Gastroenterol.* 9 : 516—520.
- Zhang Z., Farthing M. 2000. *Helicobacter pylori* in gastric malignancy: role of oxidants, antioxidants and other co-factors. In: *Helicobacter pylori*. Basic mechanisms to clinical cure. Dordrecht; Boston; London: Kluwer Acad. Publ. 689 p.

Поступила 4 IV 2007

#### MICRONUCLEI IN MUCOSE CELLS AND COLONIZATION OF HUMAN STOMACH EPITHELIUM WITH COCCOID FORMS OF *HELICOBACTER PYLORI*

L. V. Kitaeva,<sup>1</sup> I. A. Mikhailova,<sup>2</sup> D. M. Semov,<sup>2</sup> S. N. Proshin,<sup>2</sup> V. Yu. Kravtsov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> I. I. Mechnikov State Medical Academy and <sup>2</sup> All-Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg;  
<sup>1</sup> e-mail: kitaevsfamily@mail.ru

International Agency for Research on Cancer recognized as sufficient the evidence of *Helicobacter pylori* (HP) infection carcinogenicity and placed it into the 1st group of carcinogens. Micronucleus level in gastric epithelial cells of antral stomach region of patients with chronic non-atrophy gastritis ( $n = 62$ ) was studied. 40 patients of 62 had HP-associated gastritis. The HP-bacterium exists in a spiral and coccoid form. Both morphological forms were examined using immunocytochemistry. Significantly increased micronucleus number was observed in the cells of HP-infected patients compared with non-infected person ( $P < 0.05$ ). The frequency of stomach epithelium cells with micronuclei was enhanced considerably in the patients infected with the coccoid HP form. Therefore the patients with HP-associated chronic gastritis caused by the coccoid form with high degree of colonization must be considered as a group of enhanced risk of gastric carcinogenesis.

Key words: *Helicobacter pylori*, micronucleus, gastric mucosa.