

УДК 616.33/34:616-08:615:053.2

ВЛИЯНИЕ БАЗИСНОЙ ТЕРАПИИ НА ПОКАЗАТЕЛИ АПОПТОТИЧЕСКОЙ И ЦИТОКИНОВОЙ АКТИВНОСТИ У ДЕТЕЙ С ХРОНИЧЕСКОЙ ГАСТРОДУОДЕНАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ

Н.В. Лагунова, А.О. Кот

*Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского,
г. Симферополь, Украина*

В работе представлены результаты исследования апоптотической активности с помощью изучения показателей маркеров апоптоза sCD 95 и Аннексина V и цитокиновой активности посредством изучения показателей цитокинового гомеостаза FTN- α , ИЛ-8, ИЛ-10 у детей с хронической гастродуоденальной патологией.

Ключевые слова: дети, гастродуоденальная патология, апоптоз, цитокины.

Введение. В настоящее время 2,8 млн детей в Украине страдают патологией органов пищеварения. Среди хронических заболеваний органов пищеварения до 75 % составляют заболевания, связанные с патологией верхних отделов желудочно-кишечного тракта, в частности гастриты, дуодениты и язвенная болезнь. По данным ряда авторов, они составляют у детей дошкольного возраста 6,2 % и занимают пятое место в общей структуре заболеваемости, а у подростков – первое место (26,74 %) [8]. Распространенность хронической гастродуоденальной патологии у детей в 2010 г. в Украине составила 150 %, что ставит ее на второе место после заболеваний бронхолегочной системы [7].

Значительная роль в развитии и прогрессировании патологии гастродуоденальной зоны принадлежит инфекционному агенту *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) [1, 4]. Этот микроорганизм не является облигатным патогеном, т.е. инфицирование им далеко не всегда сопровождается развитием клинически выраженного заболевания [2]. Данный агент способствует развитию воспалительных и деструктивных процессов в органах гастродуоденальной зоны. Вирулентность *H. pylori* осуществляется за счет спиралевидной формы бактерии, наличия многочисленных жгутиков, адгезивности и патогенности. Патогенность выражается в выделении токсинов и

токсических ферментов. К факторам патогенности относят вакуолизирующий цитотоксин А (*VacA*), который способствует образованию вакуолей в эпителиальных клетках, что ведет к их смерти; и белок – продукт цитотоксинассоциированного гена – *CagA* (высокомолекулярный протеин массой 116–140 кДа, коэкспрессирующийся приблизительно у 70 % цитотоксинпродуцирующих штаммов *H. pylori*) [5, 11, 12]. Данный белок транспортируется из бактериальной клетки внутрь эпителиоцитов слизистой и нарушает в них системы внутриклеточной передачи сигнала. В зависимости от наличия гена *CagA Helicobacter pylori* подразделяют на *CagA*-позитивные и *CagA*-негативные [6]. Выделяют 4 серотипа в зависимости от способности штаммов *H. pylori* вызывать образование специфических сывороточных IgG: тип I (*CagA*+; *VacA*+), тип Ia (*CagA*+; *VacA*-), тип Ib (*CagA*-; *VacA*+) и тип II (*CagA*-; *VacA*-). Ряд авторов отмечает, что штаммы *H. pylori*, продуцирующие *VacA*, выделяются чаще у пациентов с язвенной болезнью, атрофическим гастритом и раком желудка и имеют неблагоприятное течение [5, 6, 9]. Также существует утверждение, что *VacA*-штаммы *H. pylori* в педиатрической практике выявляются достаточно редко [10].

Основным методом, позволяющим выявить *H. pylori* и оценить его вирулентный потенциал (серотип), является метод Western-

blot. Данный метод позволяет визуализировать полный серологический профиль *Helicobacter pylori*, обнаружить и дифференцировать более вирулентный тип I *H. pylori* от типа II, а добавление собственного рекомбинантного протеина *H. pylori* (антигена) – отличить текущую инфекцию (Current infection marker-маркер текущей инфекции) от ранее перенесенной [3].

Цель исследования. Изучение динамики показателей апоптотической и цитокиновой активности у детей с гастродуоденальной патологией на стационарном этапе лечения и оценка вирулентного потенциала *H. pylori*.

Материалы и методы. Под наблюдением находилось 103 ребенка с хронической гастродуоденальной патологией (ХГДП) в периоде обострения, проходивших лечение на гастроэнтерологических койках КРУ «Детская клиническая больница» г. Симферополя в 2009–2011 гг. в возрасте 6–17 лет. Группу контроля составили 20 практически здоровых детей, сопоставимых по полу и возрасту.

Нами были выделены три основные группы по принципу выявляемой нозологии и наличию *H. pylori*. Так, в 1 группу вошло 47 (45,6 %) детей с ХГДП, ассоциированной с *H. pylori*, во 2 группу вошел 41 (39,8 %) ребенок с ХГДП, не ассоциированной с *H. pylori*, в 3 группу – 15 (14,6 %) детей с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки (ЯБ ДПК), ассоциированной с *H. pylori*.

Всем пациентам проводилось комплексное обследование, включающее в себя ряд методов: общеклинические, лабораторные, инструментальные (внутрижелудочковая рН-метрия, фиброэзофагогастродуоденоскопия с прицельной биопсией слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки с последующим гистологическим исследованием биоптатов по общепринятой методике и тестом на *H. pylori*).

Иммунологическим методом с помощью ИФА определяли динамику показателей апоптотической активности посредством изучения количественного содержания CD-95 и Аннесина V во всех трех группах, а также цитокиновой активности посредством изучения количественного содержания TNF- α , ИЛ-8, ИЛ-10 и соотношения ИЛ-8/ИЛ-10.

Дополнительно был применен метод Western-blot для определения вирулентного потенциала *H. pylori*. Метод Western-blot – это встречная преципитация в геле антител в сыворотке крови больного с различными белками *H. pylori*, мечеными зондами, подвергнутыми разделению по молекулярной массе с помощью электрофореза и нанесенными на нитроцеллюлозу. Для этого в сыворотке крови методом Western-blot определяли наличие специфических IgG к антигенам *H. pylori*: CagA p120 (белок, ассоциированный с цитотоксином A, высокоспецифичен), VacA p95 (вакуолизирующий цитотоксин A, высокоспецифичен). В качестве тест-системы применяли набор реагентов EUROIMMUN Anti-*H. pylori* – WESTERNBLOT (IgG). В зависимости от результатов серологического исследования штаммы *H. pylori* подразделялись на 4 вышеуказанных серотипа. Результаты обрабатывались с помощью специальной программы AutoScan 2.0, позволяющей получать графическое изображение антигенного профиля инфицирующего микроорганизма с определением соответствующего серотипа.

При проведении ИФА использовался комплект оборудования фирмы AWARENESS Technology Inc. (USA): промыватель-планшет автоматический Stat Fax 2600, микропланшетный инкубатор-шейкер Stat Fax 2200 и иммуноферментный планшетный автоматический анализатор Stat Fax 2100.

Маркер sCD95 определялся наборами ИФА sCD 95(APO1/ Fas) ELISA KIT фирмы DIACLONE Research (Франция), предназначенными для количественного измерения *in vitro* растворимого CD95 (APO-1, Fas) в плазме, сыворотке, буферизованных растворах или среде культуры клеток. Фотометрирование лунок проводили на Stat Fax 2100 при длине волны 450 нм. Для перевода полученных результатов в единицы ОП измерений (ЕД/мл) строили калибровочный график.

Для количественного определения Аннесина V использован иммуноферментный набор Anpexin V Elisa (кат. NBMS 252, производитель Bender Medsystems). После остановки ферментативной реакции проводили фотометрирование лунок на Stat Fax 2100 при

длине волны 450 нм. Далее, с учетом значений оптической плотности контрольных проб, проводили математическую обработку результатов анализов.

Содержание TNF- α определяли с помощью ТОО-протеинового контура (Санкт-Петербург).

ИЛ-8 определялся набором «ИНТЕРЛЕЙКИН-8-ИФА-БЕСТ» А-8762 фирмы «Вектор Бест» (Россия), предназначенным для количественного определения человеческого ИЛ-8 в биологических жидкостях человека и культуральных средах. Фотометрирование лунок проводили на Stat Fax 2100 при длине волны 450 нм. Для перевода полученных результатов в единицы ОП измерений (ЕД/мл) строили калибровочный график и с учетом значений оптической плотности контрольных проб проводили математическую обработку результатов анализов.

ИЛ-10 определялся набором «ИНТЕРЛЕЙКИН-10-ИФА-БЕСТ» А-8774 фирмы «Вектор Бест» (Россия), предназначенным для количественного определения человеческого ИЛ-10 в биологических жидкостях человека и культуральных средах. Фотометрирование лунок проводили на Stat Fax 2100 при длине волны 450 нм. Для перевода полученных результатов в единицы ОП измерений (ЕД/мл) строили калибровочный график и с учетом значений оптической плотности контрольных проб проводили математическую обработку результатов анализов.

Диагноз хронической гастродуоденальной патологии выставлялся согласно классификации МКБ-10.

Лечение проводилось с учетом протоколов терапии по основному заболеванию.

Статистическую обработку полученных данных проводили с применением интегрированного пакета прикладных программ Statistica 6.0 for Windows XP в соответствии с общепринятыми методами медицинской статистики.

Результаты и обсуждение. При проведении обследования в клинической картине у всех детей достоверно преобладал болевой синдром с локализацией в эпигастральной области во всех трех группах в сравнении с

группой здоровых детей ($p < 0,001$). Достоверных различий в характеристике болевого синдрома при другой локализации мы не обнаружили.

Диспептический синдром достоверно проявлялся во всех трех группах клиническими симптомами в виде тошноты, рвоты, изжоги, снижения аппетита, запоров с преобладанием симптома тошноты во всех трех группах ($p < 0,001$).

Синдром неспецифической интоксикации проявлялся в виде утомляемости, слабости, головной боли и встречался достоверно чаще, чем у детей контрольной группы, являясь проявлением хронической неспецифической интоксикации ($p < 0,001$).

При эндоскопическом исследовании слизистой желудка и двенадцатиперстной кишки в 1 и 2 группах в 93,7 и 85,3 % случаев соответственно достоверно преобладал эритематозный тип поражения слизистой. В 100 % случаев в 1 группе отмечалась персистенция *H. pylori*, и уреазный тест был в 100 % случаев положительный. В 3 группе достоверно преобладала стадия обострения с преобладанием свежей язвы (60 %).

Общеклинический профиль обследования у детей с ХГДП не выявил каких-либо нарушений, и все показатели не выходили за рамки общепринятых норм.

Таким образом, приведенные данные показывают, что дети всех групп были однородны по основным признакам заболевания.

В ходе исследования нами проводилась оценка динамики (при поступлении и при выписке) показателей апоптотической (Fas (CD95) и Аннексин V) и цитокиновой активности (TNF- α , ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-8/ИЛ-10). Их характеристика представлена в табл. 1.

Проведя анализ полученных данных, можно сделать вывод о том, что как при поступлении, так и после проведенного лечения отмечались достоверно более высокие уровни показателей апоптотической (Fas (CD95) и Аннексин V) и цитокиновой (FTN- α , ИЛ-8) активности у детей из 1 группы с IgG к штамму *H. pylori* I типа (CagA+) в сравнении с группой контроля ($p < 0,001$).

Таблица 1

Характеристика показателей апоптотической и цитокиновой активности у детей с ХГДП на стационарном этапе в зависимости от вирулентности *H. pylori* (M±m)

Показатель	Контрольная группа (n=20)	1 группа тип I (CagA+) (n=18)		2 группа тип II (CagA-) (n=29)	
		до	после	до	после
Fas (CD95), пг/мл	400,67±4,05	608,68±11,46 p<0,001 p ₁ <0,05	475,00±8,98 p<0,001 p ₁ <0,01 p ₂ <0,001	555,00±12,12 p<0,001	427,11±5,32 p<0,05 p ₂ <0,001
Аннексин V, U/мл	6,25±0,44	15,28±0,99 p<0,001 p ₁ <0,05	8,25±0,42 p<0,05 p ₁ >0,05 p ₂ <0,001	12,57±0,61 p<0,001	8,39±0,45 p<0,05 p ₂ <0,01
FTN-α, пг/мл	29,86±3,97	157,57±5,65 p<0,001 p ₁ <0,001	122,85±6,50 p<0,001 p ₁ <0,01 p ₂ <0,01	101,31±6,40 p<0,001	87,01±1,93 p<0,001 p ₂ <0,05
ИЛ-8, пг/мл	8,19±0,54	30,38±0,55 p<0,001 p ₁ <0,001	12,90±1,19 p<0,05 p ₁ <0,05 p ₂ <0,001	15,20±1,49 p<0,01	9,44±0,27 p<0,05 p ₂ <0,05
ИЛ-10, пг/мл	4,10±0,25	3,45±0,12 p<0,05 p ₁ >0,05	5,69±0,11 p<0,01 p ₁ >0,05 p ₂ <0,001	3,46±0,14 p<0,05	5,64±0,10 p<0,01 p ₂ <0,001
ИЛ8/ИЛ10	2,11±0,19	8,98±0,32 p<0,001 p ₁ <0,001	2,43±0,32 p>0,05 p ₁ <0,05 p ₂ <0,001	4,35±0,43 p<0,01	1,69±0,06 p<0,05 p ₂ <0,001

Примечание. p – достоверность различия с аналогичными показателями контроля; p₁ – достоверность различия с аналогичными показателями 2-й группы; p₂ – достоверность различия с аналогичными показателями до лечения.

Выводы:

1. У детей с ХГДП имеет место усиление процессов апоптотической и цитокиновой активности, более выраженное в группе с деструктивными изменениями в слизистой оболочке гастродуоденальной зоны и в группах, ассоциированных с *H. pylori*.

2. В результате лечебных мероприятий наблюдается уменьшение уровня показателей sCD95, Аннексина V и провоспалительного ИЛ-8 и увеличение противовоспалительных цитокинов у детей всех групп, что подтверждает снижение апоптотической и цитокиновой активности, косвенно свидетельствующее об усилении репаративных процессов,

стихания воспалительного процесса, а также исчезновение жалоб и улучшение клинической картины.

3. У детей с ХГДП имеет место усиление процессов апоптотической и цитокиновой активности в сравнении с группой контроля, более выраженное у пациентов с IgG к штамму *H. pylori* I типа CagA-позитивный.

1. Гнусаев С. Ф., Иванова И. И., Апенченко Ю. С. Особенности хронических гастродуоденитов, сопровождающихся моторными нарушениями верхних отделов пищеварительного тракта у детей // Педиатрия. 2004. № 6. С.8–14.

2. *Ивашкин В. Т., Лапина Т. Л.* Гастроэнтерология XXI века // Русский медицинский журн. 2000. Т. 8, № 17. С. 697.
3. *Кишкун А. А., Арсенин С. Л.* Современные возможности изучения свойств штаммов *Helicobacter pylori* больных с заболеваниями желудка и двенадцатиперстной кишки // Материалы Междунар. научн.-практич. конф. «Современные методы лабораторной диагностики системных и инфекционных заболеваний». Симферополь, 2011. С. 40–47.
4. *Корсунский А. А., Щербаков П. Л., Исаков В. А.* Хеликобактериоз и болезни органов пищеварения у детей. М. : ИД Медпрактика, 2002. С. 168.
5. *Нургалеева Б. К.* Частота и патогенетическое значение CagA-позитивных штаммов *Helicobacter pylori* при хроническом гастрите и язвенной болезни в различных возрастных группах // РЖГГК. 2005. № 4. С. 24–28.
6. *Пасечников В. Д., Чуков С. З.* Воспалительный и иммунный ответы слизистой оболочки желудка на инфекцию *Helicobacter pylori* // Клиническая медицина. 2000. № 11. С. 9–13.
7. *Ціборовский О. М., Денисова М. Ф.* Росповсюдження хвороб органів травлення у дітей дошкільного віку залежно від впливу соціальних, екологічних та медико-біологічних факторів // Педіатрія, акушерство та гінекологія. 1996. № 3. С. 14–16.
8. *Шульгай О. М.* Зміни імунологічного статусу у дітей, хворих на хронічний гастроудоденіт, асоційований з Нр // Педіатрія, акушерство та гінекологія. 2000. № 1. С. 29–30.
9. *Cover T. L., Dooley C. P., Blaser M. J.* Characterization of a human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolating cytotoxin activity // Infect. Immun. 1990. Vol. 58. P. 603–610.
10. *Helicobacter pylori cagA+ strains and dissociation of gastric epithelial cell proliferation from apoptosis / R. M. Peek [et al.] // Journal of the National Cancer Institute. 1997. Vol. 89 (12). P. 863–868.*
11. *Rudi J., Kolb C., Maiwald M.* Diversity of *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genes and relationship to *VacA* and *CagA* protein expression, cytotoxin production and associated diseases // J. Clin. Microbiol. 1998. Vol. 36, № 4. P. 944–948.
12. *Yamaoka Y., Kodama T., Gutierrez O.* Relationship between *Helicobacter pylori iceA*, *cagA* and *vacA* status and clinical outcome: studies in four different countries // J. Clin. Microbiol. 1999. Vol. 37. P. 2274–2279.

INFLUENCE OF BASE THERAPY ON INDICATORS OF APOPTOTIC AND CYTOKINE ACTIVITY IN CHILDREN WITH CHRONIC GASTRODUODENAL PATHOLOGY

N.V. Lagunova, A.O. Kot

Crimea State Medical University named after S.I. Georgievsky, Simferopol, Ukraine

In this work presents the results of the study of apoptosis activity through the review of the indicators markers of apoptosis sCD 95 and Annexin V and cytokine activity through the review of the indicators cytokine homeostasis FTN- α , IL-8, IL-10 in children with chronic gastroduodenal pathology.

Keywords: children, gastroduodenal pathology, apoptosis, cytokine.