

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- $\alpha$ , 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- $\alpha$ , 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 значенной оптической плотности контрольных проб, проводили математическую обработку результатов анализов.

Содержание TNF- $\alpha$  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- $\alpha$ , 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- $\alpha$ , 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 <sub>1</sub> <0,05	475,00±8,98 p<0,001 p <sub>1</sub> <0,01 p <sub>2</sub> <0,001	555,00±12,12 p<0,001	427,11±5,32 p<0,05 p <sub>2</sub> <0,001
Аннексин V, U/мл	6,25±0,44	15,28±0,99 p<0,001 p <sub>1</sub> <0,05	8,25±0,42 p<0,05 p <sub>1</sub> >0,05 p <sub>2</sub> <0,001	12,57±0,61 p<0,001	8,39±0,45 p<0,05 p <sub>2</sub> <0,01
FTN-α, пг/мл	29,86±3,97	157,57±5,65 p<0,001 p <sub>1</sub> <0,001	122,85±6,50 p<0,001 p <sub>1</sub> <0,01 p <sub>2</sub> <0,01	101,31±6,40 p<0,001	87,01±1,93 p<0,001 p <sub>2</sub> <0,05
ИЛ-8, пг/мл	8,19±0,54	30,38±0,55 p<0,001 p <sub>1</sub> <0,001	12,90±1,19 p<0,05 p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,001	15,20±1,49 p<0,01	9,44±0,27 p<0,05 p <sub>2</sub> <0,05
ИЛ-10, пг/мл	4,10±0,25	3,45±0,12 p<0,05 p <sub>1</sub> >0,05	5,69±0,11 p<0,01 p <sub>1</sub> >0,05 p <sub>2</sub> <0,001	3,46±0,14 p<0,05	5,64±0,10 p<0,01 p <sub>2</sub> <0,001
ИЛ8/ИЛ10	2,11±0,19	8,98±0,32 p<0,001 p <sub>1</sub> <0,001	2,43±0,32 p>0,05 p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,001	4,35±0,43 p<0,01	1,69±0,06 p<0,05 p <sub>2</sub> <0,001

**Примечание.** p – достоверность различия с аналогичными показателями контроля; p<sub>1</sub> – достоверность различия с аналогичными показателями 2-й группы; p<sub>2</sub> – 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., Щербачев 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. *Ціборовський 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- $\alpha$ , IL-8, IL-10 in children with chronic gastroduodenal pathology.

**Keywords:** children, gastroduodenal pathology, apoptosis, cytokine.