

УДК: 616.33-002:616-018.1-092:616-008:577.175.14-053.21.6

Состояние апоптоза и цитокинового гомеостаза у детей с гастродуоденальной патологией в зависимости от патогенности *Helicobacter pylori*

А.О. Кот

ГУ «Крымский государственный медицинский университет имени С.И. Георгиевского»

Ключевые слова: дети, гастродуоденальная патология, цитокины, апоптоз

За последние годы количество заболеваний гастродуоденальной зоны у детей возросло от 100 до 140 на 1000 детей, и общая тенденция к их росту продолжает сохраняться [3, 5].

Значительная роль в развитии и прогрессировании патологии гастродуоденальной зоны принадлежит инфекционному агенту *Helicobacter pylori* [1, 2]. Этот микроорганизм не является облигатным патогеном, то есть инфицирование далеко не всегда сопровождается развитием клинически выраженного заболевания [4]. Данный агент способствует развитию воспалительных и деструктивных процессов в органах гастродуоденальной зоны. Вирулентность *Helicobacter 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 цитотоксин-ассоциированного гена – CagA (высокомолекулярный протеин массой 116-140кДа, коэкспрессирующийся приблизительно у 70% цитотоксин-продуцирующих штаммов *Helicobacter pylori*) [6, 7, 8]. 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 се-

ротипа в зависимости от способности штаммов *Helicobacter 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 *Helicobacter pylori*, продуцирующие VacA, выделяются чаще у пациентов с язвенной болезнью, атрофическим гастритом и раком желудка и имеют неблагоприятное течение [6, 9, 10]. Так же существует утверждение, что VacA штаммы *Helicobacter pylori*, в педиатрической практике выявляются достаточно редко [12].

Основным методом, позволяющим выявить *Helicobacter 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 *Helicobacter pylori* от типа II, а добавление собственного рекомбинантного протеина *Helicobacter pylori* (антигена) отличать текущую инфекцию (Current infection market-маркер текущей инфекции), от ранее перенесенной [11].

Цель работы

Целью данного исследования было изучение показателей апоптоза и цитокинового гомеостаза у детей с гастродуоденальной патологией в зависимости от вирулентности *Helicobacter pylori*.

Материал и методы

Под наблюдением находилось 48 детей с хронической гастродуоденальной патологией (хроническим гастритом, язвенной болезнью 12-ой кишки) в периоде обострения, находящихся на лечении в гастроэнтерологическом отделении КРУ «Детская клиническая больница» г. Симферополя 2009-2011 гг. в возрасте 6-17 лет. Группу контроля составили 15 практически здоровых детей, сопоставимых по возрасту и полу. По результатам исследований в зависимости от наличия гена CagA *Helicobacter pylori* все пациенты были разделены на две группы: в 1-ю группу вошли 19(39,5%) пациентов с IgG к штамму *Helicobacter pylori* I типа CagA- позитивные, во 2-ю группу вошли 29(60,5%) пациентов с IgG к штамму *Helicobacter pylori* II типа CagA- негативные. Антитела к антигену VacA выявлены не были, ни в одной из групп.

Всем пациентам проводилось комплексное обследование, включающее в себя анкетирование и клинический осмотр, фиброгастродуоденоскопию (ФГДС) с прицельной биопсией слизистой оболочки антрального отдела желудка и луковицы двенадцатиперстной кишки, с последующим гистологическим исследованием биоптатов по общепринятой методике с окраской гематоксилин-эозином. Выявление *Helicobacter pylori* проводили с помощью уреазного теста (CLO-тест). Также проводили качественное определение в сыворотке крови IgG антител к *Helicobacter pylori* на анализаторах immulite.

Нами изучались вирулентный потенциал *Helicobacter pylori* с помощью метода Western-blot. Метод Western-blot- это встречная преципитация в геле антител в сыворотке крови больного с различ-

ными белками *Helicobacter pylori*, меченными 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 *Helicobacter pylori*: CagA p120 (белок, ассоциированный с цитотоксином А, высокоспецифичен), VacA p95 (вакуолизирующий цитотоксин А, высокоспецифичен). В качестве тест системы применяли набор реагентов Euroimmun Anti- *Helicobacter pylori* – Western Blot (IgG). В зависимости от результатов серологического исследования штаммы *Helicobacter pylori* подразделялись на 4 выше указанные серотипа. Результаты обрабатывались с помощью специальной программы AutoScan 2.0, позволяющей получать графическое изображение антигенного профиля инфицирующего микроорганизма с определением соответствующего серотипа.

Нами изучались в динамике маркеры апоптоза – количественное содержание CD-95 и Аннексин V во всех трех группах методом ИФА.

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 плащечный автоматический анализатор Stat Fax 2100.

Маркер sCD95 определялся наборами ИФА sCD 95(APO1/ Fas) elisa kit фирмы «Diacclone Research» (Франция), предназначенными для количественного измерения «in vitro» растворимого CD95 (APO-1, Fas) в плазме, сыворотке, буферизованных растворах или среде культуры клеток. Фотометрирование

Табл. 1

Характеристика некоторых показателей цитокинов в сыворотке крови у детей с гастродуоденальной патологией в периоде обострения, при поступлении (M ± m)

| Показатель | Контрольная группа (n=15) | 1-я группа тип I (CagA +) (n=19) | 2-я группа тип II (CagA -) (n=29) |
|-----------------|---------------------------|--|-----------------------------------|
| sCD 95 пг/мл | 400,67 ± 4,05 | 608,68±11,46 P < 0,001 P1 < 0,05 | 555,00 ± 12,12 P < 0,001 |
| Аннексин V У/мл | 6,25 ± 0,44 | 15,28±0,99 P < 0,001 P1 < 0,05 | 12,57 ± 0,61 P < 0,001 |
| ФНО-α пг/мл | 29,86 ± 3,97 | 157,57 ± 5,65 P < 0,001 P1 < 0,001 | 101,31 ± 6,40 P < 0,001 |
| ИЛ-8 пг/мл | 8,19 ± 0,54 | 30,38 ± 0,55 P < 0,001 P1 < 0,001 | 15,20 ± 1,49 P < 0,01 |
| ИЛ-10 пг/мл | 4,10 ± 0,25 | 3,45 ± 0,12 P < 0,05 P1 > 0,05 | 3,46 ± 0,14 P < 0,05 |
| ИЛ8/ИЛ10 пг/мл | 2,11 ± 0,19 | 8,98 ± 0,32 P < 0,001 P1 < 0,001 | 4,35 ± 0,43 P < 0,01 |

Примечание: P – достоверность различия с соответствующими показателями здоровых детей; P1-достоверные различия с аналогичными показателями 1 и 2 группы

Характеристика некоторых показателей цитокинов в сыворотке крови у детей с гастроудоденальной патологией в периоде обострения, при выписке ($M \pm m$)

| Показатель | Контрольная группа (n=15) | 1-я группа тип I (CagA +) (n=19) | 2-я группа тип II (CagA -) (n=29) |
|------------------|---------------------------|---|---------------------------------------|
| sCD 95, пг/мл | 400,67 ± 4,05 | 475,00 ± 8,98 P < 0,001; P1 < 0,01; P2 < 0,001 | 427,11 ± 5,32 P < 0,05; P2 < 0,001 |
| Аннексин V, У/мл | 6,25 ± 0,44 | 8,25 ± 0,42 P < 0,05; P1 > 0,05; P2 < 0,001 | 8,39 ± 0,45 P < 0,05; P2 < 0,01 |
| ФНО-α, пг/мл | 29,86 ± 3,97 | 122,85 ± 6,50 P < 0,001; P1 < 0,01; P2 < 0,01 | 87,01 ± 1,93 P < 0,001; P2 < 0,05 |
| ИЛ-8, пг/мл | 8,19 ± 0,54 | 12,90 ± 1,19 P < 0,05; P1 < 0,05; P2 < 0,001 | 9,44 ± 0,27 P < 0,05; P2 < 0,05 |
| ИЛ-10, пг/мл | 4,10 ± 0,25 | 5,69 ± 0,11 P < 0,01; P1 > 0,05; P2 < 0,001 | 5,64 ± 0,10 P < 0,01; P2 < 0,001 |
| ИЛ8/ИЛ10, пг/мл | 2,11 ± 0,19 | 2,43 ± 0,32 P > 0,05; P1 < 0,05; P2 < 0,001 | 1,69 ± 0,06 P < 0,05; P2 < 0,001 |

Примечание: P – достоверность различия с соответствующими показателями здоровых детей; P1-достоверные различия с аналогичными показателями 2 группы; P2-достоверные различия с аналогичными показателями до лечения

лунок проводили на Stat Fax 2100 при длине волны 450 нм. Для перевода полученных результатов в единицах ОП измерения в ЕД/мл строили калибровочный график.

Для количественного определения Аннексина V использован иммуноферментный набор Annexin 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.

Также нами изучались в динамике количественное содержание ИЛ-8, ИЛ-10 и ФНО-α во всех группах методом ИФА.

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 плащечный автоматический анализатор Stat Fax 2100.

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

ИЛ-8 определялся набором «интерлейкин-8-ИФА-Бест» А-8762 фирмы «Вектор Бест» (Россия), предназначенными 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 единицах ОП измерения в 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), предназначенными для количественного определения человеческого ИЛ-10 в биологических жидкостях человека и культуральных средах. Фотомет-

рирование лунок проводили на Stat Fax 2100 при длине волны 450 нм. Для перевода полученных результатов в единицах ОП измерения в ЕД/мл строили калибровочный график и с учетом значений оптической плотности контрольных проб, проводили математическую обработку результатов анализов.

Обследованным больным диагноз гастроудоденальной патологии выставлялся согласно классификации МКБ10.

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 их обсуждение

При проведении обследования в клинической картине у всех детей преобладал болевой синдром, так во второй группе боли встречались у 27 (93%) и носили интенсивный характер, возникали натощак или через 2 часа после еды, иногда ночью, но у 2 (7%) пациентов отмечались боли после приема пищи. В первой группе болевой синдром был отмечен в 100% случаев и боли носили голодный характер, отмечались так называемые «ночные» боли, уменьшающиеся после приема пищи и щелочного питья.

Диспептический синдром проявлялся в виде рвоты, изжоги, тошноты, снижения аппетита, поноса, запоров и отмечался в обеих группах.

Астено-вегетативный синдром в виде вялости, утомляемости отмечался в обеих группах в 100% случаев.

Результаты исследования показателей изучаемых цитокинов и показателей апоптоза, у наблюдаемых больных в периоде обострения, при поступлении представлены в табл.1.

У всех обследуемых больных отмечалось достоверное повышение показателя sCD 95 и Аннексина

V в сравнении с группой контроля. Однако мы отметили достоверно более высокие показатели sCD 95 и Аннексина V у детей из 1-ой группы с IgG к штамму *Helicobacter pylori* I типа CagA- позитивные ($P < 0,001$).

Как видно из данной таблицы у всех обследуемых больных также отмечалось достоверное повышение и уровня показателей цитокинового гомеостаза ФНО- α , ИЛ-8 в сравнении с группой контроля. Причем наиболее высокие показатели отмечались у детей из 1-ой группы с IgG к штамму *Helicobacter pylori* I типа CagA- позитивные ($P < 0,001$).

Необходимо отметить, что уровень показателя провоспалительного цитокина ИЛ-8 имел достоверное увеличение более, чем в 2 раза, у всех обследуемых детей, а в 1-ой группе в 3 раза ($P < 0,001$).

А уровень показателя противовоспалительного цитокина ИЛ-10, в обеих группах достоверно имел некоторое снижение, в сравнении со здоровой группой.

Отношение же показателей провоспалительного цитокина ИЛ-8 к противовоспалительному цитокину ИЛ-10 (ИЛ-8/ИЛ-10) было значительно выше, чем у здоровых детей, причем большей частью за счет повышения провоспалительного цитокина ИЛ-8.

После проведенного лечения, которое проявлялось в уменьшении уровня sCD 95 и Аннексина V, также у всех детей отмечалось достоверное снижение провоспалительных цитокинов, как ФНО- α , так и ИЛ-8 ($p2 < 0,001$). Но у детей из 1-ой группы с IgG к штамму *Helicobacter pylori* I типа CagA- позитивный уровень ИЛ-8 достоверно оставался высоким ($P < 0,05$). Уровень противовоспалительного цитокина ИЛ-10 стал заметно выше показателей детей контрольной группы. Тем самым, отношение ИЛ-8 к ИЛ-10 приближалось к показателям здоровых детей.

Полученные нами данные по показателям апоптоза и цитокинового гомеостаза после проведенного лечения коррелировали с клинической картиной заболевания, так у 63 (96,9%) пациентов наблюдалось исчезновение болевого синдрома, у 60 (92,3%) пациентов отмечалось исчезновение признаков диспептического синдрома.

Выводы

У детей с гастроудоденальной патологией имеет место усиление процессов апоптоза и изменение баланса цитокинов провоспалительной и противовоспалительной направленности в сравнении с группой здоровых детей, более выраженное у пациентов с IgG к штамму *Helicobacter pylori* I типа CagA- позитивный.

В результате лечебных мероприятий наблюдается достоверное снижение уровня показателей sCD 95, Аннексина V, ИЛ-8 и увеличение ИЛ-10 у детей с IgG к штамму *Helicobacter pylori* I типа CagA- позитивный, подтверждающее снижение активности

апоптоза и косвенно свидетельствующее об усилении репаративных процессов в слизистой гастроудоденальной зоны, что подтверждается исчезновением жалоб и улучшением клинической картины.

Литература

1. Гусаев С.Ф. Особенности хронических гастродуоденитов, сопровождающихся моторными нарушениями верхних отделов пищеварительного тракта у детей / С.Ф. Гусаев, П.П. Иванова, Ю.С. Апенченко // Педиатрия. – 2004. – №6. – С.8-14.
2. Корсунский А.А. Хеликобактериоз и болезни органов пищеварения у детей / А.А. Корсунский, П.А. Щербаков, В.А. Псаков // –М.: ИД Медпрактика, – 2002. – С. 168.
3. Баранов А.А. Состояние здоровья детей и задачи Союза педиатров России / А.А. Баранов // Педиатрия. – 1995. – №4. – С. 7-11.
4. Пивакин В.Т., Лапина Т.А. // Русск. Мед.журн. 2000 Т8.№17С697
5. Пивакин В.Т. Эрадикация инфекции *H. pylori* и ремиссия язвенной болезни: однозначны ли эти состояния? / В.Т. Пивакин, Ф. Мезро, Т.А. Лапина // В сб. «*Helicobacter pylori*: революция в гастроэнтерологии» –М., – 1999. – С.81-88.
6. Нургалиева Б.К. Частота и патогенетическое значение CagA-позитивных штаммов *Helicobacter pylori* при хроническом гастрите и язвенной болезни в различных возрастных группах / Б.К. Нургалиева // РЖГТК. – 2005. – №4. – С.24-28
7. Yamaoka Y. Relationship between *Helicobacter pylori* *iceA*, *cagA* and *vacA* status and clinical outcome: studies in four different countries / Y.Yamaoka, T. Kodama, O.Gutierrez // J. Clin. Microbiol. — 1999. – Vol. 37. – P. 2274-2279.
8. Rudi J. Diversity of *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genes and relationship to *VacA* and *CagA* protein expression, cytotoxin production and associated diseases / J. Rudi, C. Kolb, M. Maimald // J. Clin. Microbiol. — 1998. – Vol. 36, – N 4. – P. 944-948.
9. Пасечников В.А. Воспалительный и иммунный ответы слизистой оболочки желудка на инфекцию *Helicobacter pylori* / В.А. Пасечников, С.З. Чуков // Клин. мед. – 2000. – № 11. – С. 9-13.
10. Cover T.L. Characterization of a human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolating cytotoxin activity / T.L. Cover, C.P. Dooley, M.J. Blaser // Infect. Immun. – 1990. – Vol. 58. – P. 603-610.
11. Кишкун А.А. Современные возможности изучения свойств штаммов *Helicobacter pylori* больных с заболеваниями желудка и двенадцатиперстной кишки / А.А. Кишкун, С.А. Арсенин // Материалы международной научно-практической конференции «Современные методы лабораторной диагностики системных и инфекционных заболеваний». – Симферополь. – 2011. – С. 40-47.
12. Peek R.M. *Helicobacter pylori* *cagA*+ strains and dissociation of gastric epithelial cell proliferation from apoptosis / R.M. Peek, S.F. Moss, K.T. Tham et al // Journal of the National Cancer Institute. — 1997. — Vol. 89 (12). — P. 863-8.

Стан апоптозу і цитокінового гомеостазу у дітей з гастродуоденальною патологією залежно від патогенності *Helicobacter pylori*

A.O. Kom

У цій роботі надані результати дослідження деяких показників цитокінового гомеостазу ИЛ-8, ИЛ-10 и ФНО- α і апоптозу sCD 95 і Аннексина V у дітей з гастродуоденальною патологією залежно від патогенності *Helicobacter pylori*.

Ключові слова: діти, гастродуоденальна патологія, цитокіни, апоптоз.

Condition apoptosis and a cytokine homeostasis at children with gastroduodenal pathology depending on pathogenicity of *Helicobacter pylori*.

A.O. Kot

In this work results of research of some indicators of a cytokine homeostasis of IL-8, IL-10 and TNF- α and apoptosis sCD 95 and Annexin V at children with gastroduodenal pathology depending on pathogenicity of *Helicobacter pylori* are presented.

Key words: children, gastro-duodenal pathology, cytokine, apoptosis