

Резюме диссертаций: информация из ВАК России

Е.С. Агеева — Молекулярные и клеточные основы иммунопатогенеза *Helicobacter pylori*-ассоциированных заболеваний у населения Республики Хакасии.

Ye.S. Ageyeva — Molecular and cellular bases of *Helicobacter pylori*-associated disease immunopathogenesis at Khakasia population.

Цель исследования — установить молекулярно-генетические и клеточные основы иммунопатогенеза *H. pylori*-ассоциированных заболеваний — язвенная болезнь (ЯБ), хронический гастрит (ХГ) у населения Республики Хакасии (хакасы, европеоиды).

В основу работы положены результаты комплексного клиничко-лабораторного обследования 201 больного ХГ и ЯБ (мужчин 102, женщин 99, возраст от 18 до 55 лет, средний — $42,0 \pm 4,1$ года). Обследованный контингент представлен двумя популяциями: хакасы (монголоиды, или коренное население) и остальные жители Республики Хакасии. С учетом того, что во второй популяции более 95% составляли русские, украинцы и белорусы, данная группа обозначена как «европеоиды». В качестве синонима применялся термин «пришлое население».

В I группу обследованных был включен 71 пациент (36 хакасов и 35 европеоидов) с диагнозом ЯБ двенадцатиперстной кишки, во II группу — 130 пациентов (61 хакас и 69 европеоидов) с хроническим поверхностным антральным гастритом.

Диагноз ЯБ устанавливался в период обострения заболевания на основании клинических, эндоскопических и морфологических данных. Материал для морфологического исследования забирался во время эзофагогастродуоденоскопии с прицельной биопсией из пилорического отдела, большой кривизны и малой кривизны (области угла) тела *желудка* (Ж). Для исследования брали 3 биоптата из антрального отдела и тела Ж в каждой контрольной точке на границе здоровой и пораженной ткани.

Диагноз ХГ в острый период заболевания устанавливался при морфологическом исследовании биоптатов слизистой из трех отделов Ж (пилори-

ческий отдел, малая кривизна, большая кривизна) в соответствии с классификацией, разработанной на основе Сиднейской системы (Dixon M.F., 2005).

Обязательным критерием включения в группу исследования было наличие у пациентов *H. pylori*. Больным, включенным в группы исследования, не должна была проводиться эрадикационная терапия, а также лечение следующими препаратами: антибактериальными, нестероидными противовоспалительными, ингибиторами протонной помпы, кортикостероидами (в течение 6 предшествующих месяцев).

Контрольной группой служили 60 здоровых доноров-добровольцев (30 хакасов и 30 европеоидов), сопоставимых по полу и возрасту.

Материалом для исследования являлась венозная кровь и биоптаты слизистой оболочки Ж.

На *первом этапе* исследования проводили идентификацию *H. pylori*. Присутствие бактерий должно было быть подтверждено с помощью хотя бы одного из четырех методов: быстрого уреазного теста, серологического — определение специфических *иммуноглобулинов* (Ig) G *H. pylori* в сыворотке крови («Им-Ди Спектр», г. Новосибирск), бактериоскопического исследования биоптатов слизистой оболочки Ж и/или определения видов и субтипов *H. pylori* *cagA*, *vacA* *s1*, *vacA* *s2*, *vacA* *m1*, *vacA* *m2* в биоптатах слизистой оболочки Ж методом полимеразной цепной реакции («Хеликопол» НПФ «Литех», г. Москва).

На *втором этапе* исследования определяли наличие маркеров CD4+ (клон RTU-CD4-1F6 «Novocastra», Великобритания), CD8+ (клон RTU-CD8-295 «Novocastra», Великобритания), CD20+ (клон L26 «DAKO», Дания), Ki-67 (клон «MIB-1 DAKO», Дания), Bcl-2 (клон 124 «DAKO», Дания), CPP-32 (клон JHM62

«Novocastra», Великобритания) в лимфоцитах клеточного инфильтрата слизистой оболочки Ж в биоптатах иммуногистохимическим методом. Учет содержания маркёров в мононуклеарных клетках собственной пластинки слизистой оболочки Ж проводили определением процента положительно окрашенных клеток (с ядерной и цитоплазматической метками в зависимости от использованного маркёра).

В крови оценивали иммунофенотипический состав лимфоцитов (CD3+, CD4+, CD8+) методом проточной лазерной цитофлуориметрии с применением моноклональных антител («R&D Systems», США).

Содержание цитокинов (фактор некроза опухоли- α , TNF- α), интерлейкинов (IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10) в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа. Затем проводили оценку содержания IL-2, IL-4, IL-10 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови для активации лимфоцитов при определении индуцированной продукции цитокинов (Хаитов Р.М., 2005)).

Оценивали спонтанный и индуцированный апоптоз лимфоцитов крови. Для индукции апоптотической гибели использовали неспецифический индуктор апоптотической гибели — перекись водорода в концентрации 0,01%. Учет апоптотической гибели лимфоцитов крови проводили с использованием световой микроскопии и окрашивания гематоксилином и эозином (Меньшиков В.В., 1997). При анализе использовали критерии, характеризующие кариопатологические и цитопатологические изменения в клетках.

Морфологически апоптоз проявляется в конденсации и маргинации хроматина, уменьшении объема клетки, пузырчатости и фрагментации клеточного ядра (Allen R.T., 1997; Kroemer G., 2009). Подсчитывали не менее 200 клеток, учет результатов проводили путем определения процента клеток с апоптотической морфологией. Для сравнительного анализа степени прироста индуцированного апоптоза в разных группах определяли апоптотический индекс как отношение между разницей спонтанного и индуцированного апоптоза к спонтанному, выраженное в процентах.

На *третьем этапе* был проведен анализ полиморфизма генов цитокинов (IL-1 β , IL-1Ra, IL-2, IL-6, IL-8) методом рестрикционного анализа продуктов амплификации специфических участков генома.

По результатам исследования, различные клинические фенотипы ЯБ, ассоциированной с *H. pylori*, у коренного и пришлого населения Республики Хакасии сопровождаются доминированием в различных этнических популяциях разных по генетическим характеристикам патогенов. У хакасов ЯБ ассоциирована с *cagA* штаммами *H. pylori* (95,2%), у европеоидов — с

s1s2 vacA штаммами *H. pylori* (55,6%). *H. pylori*-ассоциированный ХГ также характеризуется молекулярно-генетической дифференцированностью возбудителя: у хакасов ХГ ассоциирован с *m2 vacA* штаммами (62,9%), у европеоидов — с *m1 vacA* штаммами (62,1%).

Изменения субпопуляционного состава клеточного инфильтрата в слизистой оболочке Ж у хакасов и европеоидов с *H. pylori*-ассоциированной гастродуоденальной патологией характеризуются активацией гуморального (увеличение числа CD20+-лимфоцитов) и клеточного звеньев иммунитета (возрастание количества CD4+- и CD8+-лимфоциты).

Дисбаланс между апоптозом (CPP-32 и Bcl-2) и пролиферацией (Ki67) лимфоцитов слизистой оболочки Ж у хакасов и европеоидов с ХГ и ЯБ, ассоциированных с *H. pylori*, имеет одинаковую направленность, но разную интенсивность: активность апоптоза лимфоцитов (отношение показателей CPP-32 и Bcl-2) выше при ХГ, чем при ЯБ; у хакасов более выражено по сравнению с европеоидами.

Изменения численности субпопуляций лимфоцитов крови при гастродуоденальной патологии, ассоциированной с инфекцией *H. pylori*, у коренного и пришлого населения характеризуются снижением числа CD3+-, CD4+- и CD8+-лимфоцитов у хакасов, как при ХГ, так и при ЯБ и увеличением количества CD4+- и CD8+-лимфоцитов у европеоидов, больных ХГ и ЯБ, по сравнению с аналогичными показателями у здоровых доноров.

Течение *H. pylori*-ассоциированной гастродуоденальной патологии у больных, относящихся к разным этническим группам и проживающих на территории Республики Хакасии, сопровождается изменением числа лимфоцитов крови, вступивших в апоптоз (наиболее выраженным у хакасов по сравнению с европеоидами).

Чувствительность лимфоцитов, полученных у пациентов с гастродуоденальной патологией, ассоциированной с инфекцией *H. pylori*, к действию неспецифического модулятора апоптоза (0,01% раствора перекиси водорода) *in vitro* снижена по сравнению с лимфоцитарными клетками крови у здоровых доноров; выраженность указанных изменений наиболее значима у европеоидов, чем у хакасов. При ЯБ апоптотический индекс снижен, что свидетельствует о снижении функционального потенциала иммунокомпетентных клеток при длительной инфекции *H. pylori*.

Дисбаланс интерлейкинов сыворотки крови у хакасов и европеоидов, страдающих *H. pylori*-ассоциированной гастродуоденальной патологией, характеризуется увеличением концентрации TNF- α , IL-4 и IL-10. Особенности спонтанной и фитогем-агглютинин-индуцированной продукции интерлейкинов мононуклеарными лейкоцитами крови у пациентов с *H. pylori*-сопряженными ХГ и ЯБ

закljučаются в снижении базальной и резервной продукции IL-2 у хакасов и увеличением продукции IL-4, IL-10 у европеоидов.

Распространенность полиморфизмов генов цитокинов C+3953T IL-1 β , IL1-Ra VNTR, -330 T/G IL-2, -174 G/C IL-6, -251 T/A IL-8 имеет выраженные межпопуляционные различия и является определяющим в иммунопатогенезе *H. pylori*-сопряженных ХГ и ЯБ у хакасов и европеоидов.

Иммуногенетическими предикторами *H. pylori*-ассоциированной ЯБ у хакасов являются генотип AA промоторного региона -251 T>A гена IL-8 (*отношение шансов* – ОШ=3,15), генотип GG промоторного региона -330 T/G IL-2 (ОШ=1,91); у европеоидов – генотип CC промоторного региона C+3953T гена IL-1 β (ОШ=2,63), генотип R2R3 гена IL-1Ra (ОШ=8,08), генотип CC промоторного региона -174 G>C гена IL-6 (ОШ=2,25). У хакасов риск развития ХГ при инфицировании *H. pylori* ассоциирован с генотипом СТ полиморфизма C+3953T гена IL-1 β (ОШ=1,97); у европеоидов – с генотипом R2R3 гена IL-1Ra (ОШ=4,41) и генотипом GT промоторного региона - 330 T/G гена IL-2 (ОШ=2,35).

Фактором, снижающим риск развития ЯБ, ассоциированной с *H. pylori*, у хакасов является генотип ТА промоторного региона -251 T>A гена

IL-8 (ОШ=0,40), у европеоидов – генотипы СТ и ТТ промоторного региона C+3953T гена IL-1 β (ОШ=0,51 и ОШ=0,44 соответственно), генотипы R3R4 и R4R4 гена IL-1Ra (ОШ=0,30 и ОШ=0,51 соответственно). Риск развития ХГ, ассоциированного с *H. pylori*, снижен у хакасов и европеоидов – носителей генотипа ТТ промоторного региона -330 T/G IL-2 (ОШ=0,42 и ОШ=0,28 соответственно).

Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Хакасский государственный университет им. Н.Ф. Катанова».

Научные консультанты: доктор медицинских наук, профессор **Н.В. Рязанцева**; доктор медицинских наук, профессор **О.В. Штыгашева**.

Дата защиты: 25.05.2012 на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Сибирском государственном медицинском университете.

Ю.В. Эмбутниекс – Состояние минеральной плотности костной ткани у больных с некоторыми заболеваниями органов пищеварения.

Yu.V. Embutnieks – Bone mineral density in patients with digestive diseases

Цель исследования – разработать критерии прогнозирования нарушений метаболизма костной ткани и повысить эффективность профилактики и лечения остеопении на основании патогенетических особенностей ее развития у гастроэнтерологических больных.

В основу работы положены результаты обследования 1026 больных. Для оценки *минеральной плотности кости* (МПК) всем больным проводилась двухэнергетическая рентгеновская абсорбциометрия в области поясничного отдела позвоночника и проксимального отдела бедренной кости. По данным последней, снижение МПК выявлено у 742 человек (72,3 $\pm$ 1,4%).

Из дальнейшего исследования исключались лица с сопутствующей патологией, сочетающейся с риском снижения МПК (заболевания, протекающие с нарушениями функции щитовидной и паращитовидной желез, системные заболевания соединительной ткани, заболевания крови, сахарный

диабет, наличие сердечной недостаточности от II ст. и выше, легочной недостаточности от II ст. и выше, почечной недостаточности), а также получающие заместительную гормональную терапию, антиконвульсанты, трициклические антидепрессанты, препараты тироксина, глюкокортикостероиды, больные с новообразованиями и в возрасте старше 70 лет.

Таким образом, в исследование было включено 422 пациента, среди них страдающие хроническим панкреатитом ($n=95$), желчнокаменной болезнью ($n=130$), циррозом печени различной этиологии ($n=134$), больные глютенчувствительной целиакией ($n=63$). Среди обследованных женщин было 321 (76,1%), у 239 (74,5%) из которых менструальная функция отсутствовала, а мужчин – 101 (23,9%). Средний возраст мужчин и женщин достоверно не отличался.

Длительность основного заболевания у 62,8% больных составила менее 5 лет, у 37,2% – 5 лет

и более. Из всех обследованных дефицит массы тела отмечался лишь у 3% больных, достоверно преобладали пациенты с нормальным *индексом массы тела* (ИМТ) — 51,9% или ее избытком — 45%. У 17,8% больных в анамнезе имелось указание на наличие перенесенных переломов.

В работе использованы следующие методы:

— клиническое обследование, включающее сбор жалоб, изучение анамнеза, объективное обследование; приверженность к употреблению алкогольных напитков исследовалась с помощью вопросника «CAGE»;

— в условиях клинической лаборатории по общепринятым методикам проводились общеклинические исследования: анализ крови и мочи, биохимическое исследование крови, дополнительно исследовались содержание кальция, фосфата, магния в сыворотке крови, а также экскреция креатинина, кальция и фосфора с мочой;

— методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сыворотке крови определялись метаболиты витамина D_3 — $25(OH)D_3$ и $1,25(OH)_2D_3$; дефицитом являлось снижение концентрации $25(OH)D_3$ ниже 30 нг/мл, а $1,25(OH)_2D_3$ — ниже 40 пкг/л;

— уровень гормонов кальцитонина, кортизола, тестостерона, эстрадиола, *паратиреоидного гормона* (ПТГ), а также уровень *фактора некроза опухоли- α* (ФНО- α) и *продукта распада коллагена I типа* (CrossLaps) в сыворотке крови определялся методом *иммуноферментного анализа* (ИФА). Уровень ПТГ исследовался в утренней пробе крови натощак. Референсные значения для ПТГ составили от 6,67 до 55,24 пг/мл. С целью исследования концентрации кальцитонина применялся набор фирмы «Biomerica» (США). За норму у мужчин принимались значения кальцитонина от 0,7 до 30 пкмоль/л, у женщин — от 0,7 до 13 пкмоль/л. Для определения кортизола использовался набор фирмы «Adaltis» (Италия). Норма для лиц обоих полов была одинакова — от 60 до 230 нг/мл. Тестостерон определяли методом ИФА при помощи набора реактивов «Diagnostics Biochem Canada Inc»; референсные значения тестостерона для женщин были в пределах от 0,2 до 1 нг/мл, для мужчин — от 3 до 12 нг/мл. Эстрадиол определяли, используя наборы реактивов фирмы «Adaltis» (Италия); референсные значения — для женщин: в фолликулярную фазу — от 30 до 120 пг/мл, в овуляторный пик — от 130 до 370 пг/мл, в лютеиновую фазу — от 70 до 250 пг/мл, в менопаузе — от 15 до 60 пг/мл; для мужчин — в пределах от 15 до 60 пг/мл. Уровни ФНО- α и CrossLaps определяли при помощи наборов фирм «Bender MedSystems» (США) и «Nordicbioscience» (Дания); отклонением ФНО- α от нормы являлось повышение его значения свыше 30 пг/мл у обоих полов и CrossLaps у женщин с сохраненной менструальной функцией — более

0,738 нг/мл, в менопаузе — свыше 1,351 нг/мл, а у мужчин — более 0,748 нг/мл.

Для выявления других сопутствующих заболеваний со стороны желудочно-кишечного тракта проводились эзофагогастродуоденоскопия, интестиноскопия и ультразвуковое исследование органов брюшной полости.

Для оценки МПК всем больным выполнялась двухэнергетическая рентгеновская абсорбциометрия (Lunar DPXRT21200) в области поясничного отдела позвоночника и шейки бедренной кости. Определение МПК проводилось по критерию T — сравнение выявленной МПК с нормой, соответствующей пику костной массы (использовался у женщин в постменопаузальном периоде и у мужчин в возрасте 50 лет и старше) и критерию Z — сравнение показателя полученной МПК со среднестатистической нормой для того же возраста, что и у больного (использовался у женщин до наступления менопаузы и у мужчин моложе 50 лет). Результаты выражались в *стандартных квадратичных отклонениях* (SD): снижение критериев от $-1,0$ до $-2,5$ SD соответствовало остеопении, снижение меньше $-2,5$ SD — остеопорозу.

Для оценки 10-летнего риска остеопоротических переломов была использована методика FRAX с применением компьютерной программы FRAX™, с количественной оценкой суммарного риска на основании математического анализа уже имеющихся факторов риска остеопороза.

По результатам исследования, снижение МПК встречается у 64,7% больных с некоторыми заболеваниями органов пищеварения (60,4–69,0 95% ДИ — *доверительный интервал*), в том числе у 67,8% женщин в менопаузе (62,1–73,5 95% ДИ), у 63% женщин с сохраненной менструальной функцией (57,0–73,8 95% ДИ) и 58,4% мужчин (48,8–68 95% ДИ).

Менопауза у женщин с заболеваниями органов пищеварения достоверно увеличивает только частоту остеопороза — *относительный риск* (ОР)=2,52; 1,31–4,82 95% ДИ. Наличие предшествующих переломов приводит к статистически значимому увеличению частоты остеопении с 12,3 до 87,7% (ОР=1,42; 1,25–1,61 95% ДИ). Возраст больных и ИМТ достоверно не влияют на МПК и частоту остеопении.

При заболеваниях органов пищеварения остеопения ассоциирована с дефицитом кальцитриола и кальцитриола (встречается у 43,4 и 40% больных соответственно). ОР развития остеопении, обусловленный дефицитом кальцитриола, у женщин в менопаузе составляет 1,48 (1,26–1,75 95% ДИ), у женщин с сохраненной менструальной функцией 2,4 (1,47–3,78 95% ДИ), у мужчин 1,59 (1,15–2,22 95% ДИ). Дефицит кальцитриола увеличивает ОР остеопении у женщин в менопаузе до 1,73 (1,43–2,09 95% ДИ), у женщин с сохраненной

менструальной функцией до 1,62 (1,26–2,08 95% ДИ) и у мужчин до 1,06 (0,76–1,48 95% ДИ).

Ведущим патогенетическим механизмом потерь МПК при заболеваниях органов пищеварения является вторичный гиперпаратиреоидизм, который развивается у 46% больных и увеличивает ОР остеопении у женщин в менопаузе до 1,33 (1,12–1,57 95% ДИ), при сохраненной менструальной функцией – ОР=3,38 (2,04–5,6 95% ДИ) и у мужчин – ОР=2,69 (1,71–4,23 95% ДИ).

У больных с заболеваниями органов пищеварения отмечается дефицит половых гормонов. Среди женщин снижение уровня эстрогенов может быть обусловлено как менопаузой, так и встречаться у 32,9% женщин с сохраненной менструальной функцией. Дефицит тестостерона отмечается у 26,7% мужчин. ОР остеопении при снижении уровня эстрадиола у женщин в менопаузе составляет 1,12 (0,62–1,29 95% ДИ), при сохраненной менструальной функции – 1,49 (1,11–2,02 95% ДИ), а у мужчин при снижении уровня тестостерона ОР=1,75 (1,32–2,32 95% ДИ).

Повышенная активность воспаления при болезнях органов пищеварения увеличивает процессы резорбции костной ткани, что подтверждается наличием прямой корреляционной взаимосвязи между уровнями CrossLaps и ФНО- α ($r=0,28$, $p=0,017$) и между уровнями кальцитонина и ФНО- α ($r=0,31$, $p=0,02$). Повышение ФНО- α , выявляемое у 38,4% больных, достоверно увеличивает частоту остеопении с 49 до 89% ($p<0,05$).

К группе риска развития остеопении относятся больные хроническим панкреатитом с экзокринной недостаточностью поджелудочной железы (ОР=1,2; 1,06–1,29 95% ДИ), больные желчнокаменной болезнью с тяжелой степенью билиарной недостаточности (ОР=1,4; 1,28–1,75 95% ДИ), больные целиакией с высокой степенью иммунологической активности (ОР=1,4; 1,19–1,62 95% ДИ) и больные с первичным билиарным циррозом (ОР=1,6; 1,46–1,76 95% ДИ).

Заболевания органов пищеварения повышают вероятность 10-летнего риска остеопоротических

переломов (по шкале FRAX) для женщин в менопаузе с $6,5\pm 1,2$ до $9,7\pm 5,2\%$ ($p=0,003$), для женщин с сохраненной менструальной функцией с $4,05\pm 0,4$ до $6,96\pm 1,9\%$ ($p<0,01$) и для мужчин – с $4,2\pm 1,2$ до $6,3\pm 1,5\%$ ($p<0,01$). Длительность заболевания более 5 лет увеличивает частоту остеопении с 53 до 84% (ОР=1,58; 1,38–1,81 95% ДИ).

У больных с заболеваниями органов пищеварения выделены следующие варианты остеопении. Среди женщин: постменопаузальная остеопения – 40%, смешанная (постменопаузальная и вторичная) – 36%, вторичная – 19%, идиопатическая – 5%. Среди мужчин: вторичная остеопения – 61%, гипоандрогенная – 24% и смешанная (гипоандрогенная и вторичная) – 15%.

Заместительная терапия при дефиците витамина D альфакальцитолом (1 мкг/сут) и кальцием (1 г/сут) в течение 6 мес увеличивает МПК в позвоночнике у 30% больных в среднем на $3,5\pm 2,9\%$, в шейке бедренной кости – у 25% больных в среднем на $1,07\pm 3,5\%$. Нежелательных явлений, приводящих к отмене терапии, не отмечается.

Антирезорбтивная терапия бисфосфонатами увеличивает МПК в позвоночнике у 90% больных в среднем на $4,83\pm 3,27\%$ при приеме алендроната и у 70% больных в среднем на $6,05\pm 3,21\%$ при приеме ибандроната; в шейке бедренной кости – у 80 и 45% больных (в среднем на $2,42\pm 2,84$ и $4,75\pm 1,7\%$ соответственно). Нежелательных явлений, приводящих к отмене терапии, не зарегистрировано.

Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук выполнена в Центральном научно-исследовательском институте гастроэнтерологии Департамента здравоохранения г. Москвы.

Научный консультант: доктор медицинских наук, профессор В.Н. Дроздов.

Дата защиты: 30.03.2012 на заседании диссертационного совета Д 850.002.01 при Центральном научно-исследовательском институте гастроэнтерологии Департамента здравоохранения г. Москвы.