

Оригінальні дослідження

УДК 616.33-002.2:579.835.12-072

А.А. Авраменко

ВЫЯВЛЕНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ «ДЕПО» АКТИВНЫХ ФОРМ ХЕЛИКОБАКТЕРНОЙ ИНФЕКЦИИ ПРИ ИХ РАННЕМ ФОРМИРОВАНИИ ПО УРОВНЮ НАТУРАЛЬНЫХ КИЛЛЕРОВ

Проблемная лаборатория по вопросам хронического хеликобактериоза
Черноморский государственный университет имени Петра Могилы, г. Николаев

Резюме. Проведен сравнительный анализ результатов определения внутриклеточных «депо» активных форм НР-инфекции при высокой степени обсеменения слизистой – (+++) – (++++) у 42 больных хроническим неатрофическим гастритом двумя методами: сравнительной характеристикой данных уреазного теста и микроскопирования окрашенных по Гимза мазков-отпечатков, материал для которых был получен из одного биоптата, и по уровню натуральных киллеров (CD

16) в крови. Выяснено, что по первой методике внутриклеточные «депо» активных форм НР-инфекции выявлялись у 13 (30,9 %), а по второй методике – у 38 (90,5 %) пациентов.

Ключевые слова: хронический неатрофический гастрит, внутриклеточные «депо» активных форм хеликобактерной инфекции, уреазный тест, микроскопирование мазков – отпечатков, уровень натуральных киллеров.

Введение. Выявление внутриклеточных «депо» хеликобактерной инфекции (НР) является основанием для проведения последовательной антихеликобактерной терапии с целью максимального удаления НР-инфекции, что предупреждает развитие ранних рецидивов хронического неатрофического гастрита [2]. Разработанная нами методика по определению внутриклеточных «депо» НР-инфекции основана на сравнительной характеристике данных, полученных при проведении уреазного теста и микроскопирования окрашенных мазков-отпечатков с использованием материала из одного биоптата [9]. Однако такая методика даёт высокий процент выявления только при накоплении значительного количества активных форм бактерий в «депо», в то время как выявление процесса формирования ранних «депо» с небольшим количеством бактерий в париетальных клетках по этой методике весьма затруднительно. Это послужило поводом для разработки биохимического метода выявления внутриклеточных «депо» НР-инфекции по уровню в крови натуральных киллеров (CD-16), которые чутко реагируют на проникновение внутрь клетки бактерий и вирусов [1, 8, 10]. Отсутствие в доступной нам литературе сравнительных данных по выявлению внутриклеточных «депо» НР-инфекции у больных хроническим неатрофическим гастритом в стадии обострения при параллельном использовании двух методик стали поводом для наших исследований.

Цель исследования. Провести исследования по частоте выявления внутриклеточных «депо» НР-инфекции у больных хроническим неатрофическим гастритом в стадии обострения при параллельном использовании двух методик: по сравнительной характеристике данных, полученных при проведении уреазного теста и микроско-

пирования окрашенных мазков-отпечатков с использованием материала из одного биоптата, и по уровню натуральных киллеров (CD 16) в крови пациентов.

Материал и методы. Проведена сравнительная характеристика по частоте выявления внутриклеточных «депо» НР-инфекции при комплексном обследовании с параллельным использованием двух методик: по сравнительной характеристике данных, полученных при проведении уреазного теста и микроскопирования окрашенных мазков-отпечатков с использованием материала из одного биоптата, и по уровню натуральных киллеров (CD 16) в крови пациентов у 42 больных хроническим неатрофическим гастритом в стадии обострения.

Возраст больных колебался от 27 до 49 лет (средний возраст составил $32,13 \pm 1,43$ года); лиц мужского пола было 27 (64,3 %), женского – 15 (35,7 %).

Комплексное обследование больных включало: рН-метрию по методике Чернобрового В.Н., эзофагогастродуоденоскопию (ЭГДС) по общепринятой методике, двойное тестирование на НР (уреазный тест и микроскопирование окрашенных по Гимза мазков-отпечатков), биопсийный материал для которых брался из четырёх топографических зон желудка: из средней трети антрального отдела и тела желудка по большой и малой кривизне по разработанной нами методике, а также гистологические исследования состояния самой слизистой желудка в этих же зонах, согласно последней классификации. Определение уровня натуральных киллеров (CD 16) в крови проводилось по общепринятой методике либо накануне комплексного обследования, либо сразу после его проведения [6, 9, 10, 13].

Последовательность комплексного обследования: после сбора анамнеза сначала проводилась рН-метрия, затем – ЭГДС с забором биопсийного материала для проведения тестирования на НР и гистологических исследований слизистой желудка. Исследование проводилось утром, натощак, через 12-14 часов после последнего приёма пищи.

Полученные данные были обработаны статистически с помощью t-критерия Стьюдента с вычислением средних величин (М) и оценкой вероятности отклонений (m). Изменения считались статистически достоверными при $p < 0,05$. Статистические расчёты выполнялись с помощью электронных таблиц Excel для Microsoft Office.

Результаты исследования и их обсуждение. При сборе анамнеза было выяснено, что сроки обострения колебались от двух до пяти дней. Также при опросе подтвердилось отсутствие приёма больными в течение трёх месяцев препаратов, влияющих на активную форму НР-инфекции: антибиотиков, препаратов висмута, ингибиторов протонной помпы, ферментов поджелудочной железы, а также рвоты в течение последних двух недель [3, 4, 5, 12].

Данные рН-метрии до и после лечения представлены в таблице 1.

При проведении ЭГДС у всех пациентов в 100 % случаев отсутствовал активный язвенный процесс как на слизистой двенадцатиперстной кишки, так и на слизистой желудка, однако у 6 (14,2 %) пациентов имелись проявления перенесенных в прошлом язвенной болезни двенадцатиперстной кишки в виде рубцовой деформации разной степени выраженности.

При анализе данных, полученных при первичном гистологическом исследовании состояния слизистой желудка, у всех пациентов в 100 % случаев был выявлен хронический воспалительный процесс как в активной, так и в неактивной форме при разной степени тяжести – от (+) до (+++).

Данные по степени обсеменения слизистой желудка НР-инфекцией по топографическим зонам желудка представлены в таблице 2.

При анализе данных, полученных при двойном тестировании на НР, хеликобактерная инфекция была выявлена у всех пациентов в 100 % случаев в активной форме при высокой степени обсеменения слизистой желудка – (+++) – (++++). Без достоверного ($p > 0,05$) различия по топографическим зонам.

Данные по выявлению внутриклеточных «депо» НР-инфекции по двум методикам – по сравнительной характеристике данных, полученных при проведении уреазного теста и микроскопирования окрашенных мазков-отпечатков с использованием материала из одного биоптата, и по уровню натуральных киллеров (CD 16) в крови этих же пациентов представлены в таблице 3.

Внутриклеточные «депо» НР-инфекции, которые выявлялись при двойном тестировании, присутствовали в 100 % случаев только в слизистой тела желудка: по малой кривизне – у 4 (9,5 %), по большой кривизне – у 5 (11,9 %), в слизистой тела желудка и по малой, и по большой кривизне – у 4 (9,5 %) пациентов.

Уровень натуральных киллеров у 38 пациентов, в число которых входили и все те 13 пациентов, у которых внутриклеточное «депо» было

Таблица 1

Уровень кислотности у обследованных больных хроническим неатрофическим гастритом (n=42)

Уровень кислотности	Количество случаев	%
Гиперацидность выраженная	-	-
Гиперацидность умеренная	8	19,1
Нормаацидность	17	40,5
Гипоацидность умеренная	11	26,2
Гипоацидность выраженная	6	14,2
Анацидность	-	-

Примечание. n – количество исследований

Таблица 2

Степень обсеменения слизистой желудка НР-инфекцией у больных хроническим неатрофическим гастритом по топографическим зонам (n=42)

Топографические зоны желудка	Степень обсеменения слизистой желудка НР-инфекцией M±m / (+)	
	Активная форма	Кокковая форма
Антральный отдел, большая кривизна	2,64±0,28	-
Антральный отдел, малая кривизна	2,69±0,28	-
Тело желудка, большая кривизна	2,86±0,28	-
Тело желудка, малая кривизна	3,21±0,28	-

Примечание. n – количество исследований

Таблица 3

Процент выявления внутриклеточных «депо» хеликобактерной инфекции у больных хроническим неатрофическим гастритом при параллельном применении двух различных методик (n=42)

Методики тестирования внутриклеточных «депо» НР- инфекции			
Двойное тестирование (уреазный тест и микроскопирование мазка-отпечатка)		Уровень натуральных киллеров (CD 16) в крови пациентов	
Количество выявлений	%	Количество выявлений	%
13	30,9	38	90,5

Примечание. n – количество исследований

Таблица 4

Показатели уровня натуральных киллеров у больных хроническим неатрофическим гастритом в стадии обострения

Показатели уровня натуральных киллеров у обследуемых больных (n=38)			
Процентное выявление		Абсолютное количество	
Норма (%)	При исследовании M±m / %	Норма (клеток/мкл)	При исследовании M±m / клеток/мкл
12-23	32,13±0,21	70-552	734,14±10,6

Примечание. n – количество исследований

выявлено первым способом, был повышен, причём повышен был не только процент выявления данной группы иммунных тел, который колебался от 27 до 40 %, но и их абсолютное количество, которое колебалось от 610 до 884 клеток/мкл. Данные этих исследований представлены в таблице 4.

Полученные данные объяснимы с точки зрения жизнедеятельности хеликобактерной инфекции и стадийности развития хронического неатрофического гастрита. По возрасту пациенты соответствовали двум стадиям развития хронического гастрита: 2-ой стадии – стадии пангастрита, для которой характерна нормацидность, и 3-ей стадии – стадии начальных изменений морфологии желез слизистой желудка и формирования функциональной гипоацидности (анацитности), что подтверждают данные рН-метрии и данные по топографии расселения и степени обсеменения НР-инфекцией слизистой желудка.

Тело желудка – наиболее выгодная для НР область желудка из-за большой концентрации париетальных клеток, как источника соляной кислоты и места, где возможно образование защитного внутриклеточного «депо». При высокой концентрации хеликобактерная инфекция легко нейтрализует соляную кислоту за счёт аммиака, образующегося под действием фермента уреазы, которую вырабатывают бактерии, из пищевой мочевины. Вырабатывая специфический белок, который блокирует синтез соляной кислоты, НР-инфекция по внутриклеточным каналам проникает внутрь париетальных клеток и формирует «депо» [7]. Однако даже небольшая концентрация бактерий в париетальной клетке, с нашей точки зрения, меняет отношение иммунной системы к этой клетке, принимая её за чужеродную,

что приводит к росту уровня натуральных киллеров, которые осуществляют лизис поражённых бактериями клеток [1, 8, 11, 14, 15, 16].

Вывод

Для более раннего и полноценного выявления внутриклеточных «депо» НР-инфекции у больных хроническим неатрофическим гастритом необходимо проводить диагностику параллельно двумя методами: по сравнительной характеристике данных, полученных при проведении уреазного теста и микроскопирования окрашенных мазков-отпечатков с использованием материала из одного биоптата, и по уровню натуральных киллеров (CD 16) в крови пациентов.

Перспективы дальнейших исследований.

Дальнейшее изучение причин, влияющих на формирование «внутриклеточных» «депо» НР-инфекции и разработка новых биохимических методов по раннему выявлению данной инфекции у больных хроническим неатрофическим гастритом.

Литература

1. Абакушина Е.В. Основные свойства и функции НК-клеток человека/ Е. В. Абакушина, Е.Г. Кузьмина, Е.И. Коваленко // Иммунология. – 2012. – № 4. – С. 220-224.
2. Авраменко А.А. Влияние внутриклеточных «депо» хеликобактерной инфекции на сроки обострения хронического неатрофического гастрита / А.А. Авраменко // Кліні. та експерим. патол. – 2016. – № 2 (Ч. 1). – С. 8-11.
3. Авраменко А.А. Влияние ингибиторов протонной помпы на формирование неактивных (коккообразных) форм хеликобактерной инфекции / А.А. Авраменко // Кліні. фармація. – 2013. – Т. XVII, № 4. – С. 15-17.
4. Авраменко А.А. Влияние препаратов, содержащих ферменты поджелудочной железы, на выявление активных форм хеликобактерной инфекции у больных хроническим хеликобактериозом / А.А. Авраменко //

- Заг. патол. та патол. фізіол. – 2013. – Т. 8, № 4. – С. 24-27.
5. Авраменко А.А. Влияние рвоты на выявление активных форм хеликобактерной инфекции у больных хроническим хеликобактериозом / А.А. Авраменко // Заг. патол. та патол. фізіол. – 2013. – Т. 8, № 3. – С. 94-97.
 6. Авраменко А.А. Достоверность стул-теста при тестировании больных хроническим хеликобактериозом при наличии активных и неактивных форм хеликобактерной инфекции на слизистой оболочке желудка / А.А. Авраменко // Сучас. гастроентерол. – 2014. – № 3 (77). – С.
 7. Авраменко А. А. Язвенная болезнь (очерки клинической патофизиологии) / А.А. Авраменко, А.И. Боженко, В.С. Гойдык. – Одесса, ООО «РА «АРТ-В», 2008. – 304 с.
 8. Дифференциальная диагностика гранулематоза Вегенера с экстранозальной НК/Т-клеточной лимфомой назального типа / В.И. Васильев, С.Х. Седышев, В.Р. Городецкий [и др.] // Терапевт. архив. – 2012. – № 7. – С. 79-83.
 9. Патент на корисну модель 17723 Україна, UA, МПК А61В1/00 Спосіб діагностики хронічного гастриту типу В, а також виразкової хвороби та раку шлунка, асоційованих з гелікобактерною інфекцією / А.О. Авраменко. – № u 200603422; заявл. 29.03.06; опубл. 16.10.06. Бюл. № 10.– 4 с.
 10. Патент на корисну модель № 96 920 Україна, UA, МПК (2015.01) А61В 1/00 Спосіб тестування внутрішньо-клітинних «депо» гелікобактерної інфекції у хворих на хронічний гелікобактеріоз за Авраменком А.О. / А.О. Авраменко. – № u 201409563; заявл. 01.09.2014; опубл. 25.02.2015. Бюл. № 4. – 3 с.
 11. Противоопухолевая цитотоксическая активность лимфокино-активированных киллеров / Н.П. Велижева, О.С. Жукова, О.В. Лебединская [и др.] // Сибир. онкол. ж. – 2008. – № 1 (25). – С. 39-44.
 12. Чубенко С.С. Опыт клинического использования экспресс-определения антигенов Н. Pylori в кале при диагностике хеликобактериоза / С.С. Чубенко, И.Р. Иманова, Д.С. Чубенко // Сучас. гастроентерол. – 2009. – № 3 (47). – С. 5-8.
 13. Ендоскопія травного каналу. Норма, патологія, сучасні класифікації / За ред. В.Й. Кімаковича і В.І. Нікішаєва. – Львів: Медицина Світу, 2008. – 208 с., іл. 4.
 14. Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in cancer and infection / J. Koch, A. Steinle, C. Watzl [et al.] // Trends in Immunology. – 2013. – Vol. 34, Issue 4. – P. 182-191.
 15. Spits H. Development of human T and natural killer cells / H. Spits, L.L. Lanier, J.H. Phillips // Blood. – 1995. – № 85. – P. 2654-2670.
 16. Unni A. M. Intrinsic sensor of oncogenic transformation induces a signal for innate immunosurveillance / A.M. Unni, T. Bondar, R. Medzhitov // Proceedings of the National Academy of Science U S A. – 2008. – Vol. 105. – P. 1686-1691.

ВИЯВЛЕННЯ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННИХ «ДЕПО» АКТИВНИХ ФОРМ ГЕЛІКОБАКТЕРНОЇ ІНФЕКЦІЇ ПРИ ЇХ РАНЬОМУ ФОРМУВАННІ ЗА РІВНЕМ НАТУРАЛЬНИХ КІЛЕРІВ

А.О. Авраменко

Резюме. Проведено порівняльний аналіз результатів визначення внутрішньоклітинних «депо» активних форм НР-інфекції при високому ступені обсіменіння слизової – (+++) – (++++) у 42 хворих на хронічний неатрофічний гастрит двома методами: порівняльною характеристикою даних уреазного тесту і мікроскопування, забарвлених за методом Гімзи мазків-відбитків, матеріал для яких було отримано з одного біоптату, і за рівнем натуральних кілерів (CD 16) у крові. З'ясовано, що за першою методикою внутрішньоклітинні «депо» активних форм НР-інфекції виявлялися у 13 (30,9 %), а за другою методикою – у 38 (90,5 %) пацієнтів.

Ключові слова: хронічний неатрофічний гастрит, внутрішньоклітинні «депо» активних форм гелікобактерної інфекції, уреазний тест, мікроскопування мазків - відбитків, рівень натуральних кілерів.

DETECTION OF INTRACELLULAR "DEPO" ACTIVE FORMS H. PYLORI INFECTION DURING EARLY FORMATION LEVEL NATURAL KILLER

А.А. Avramenko

Abstract. Comparative analysis of results of the determination of intracellular "depot" of active forms of HP infection with a high degree of contamination of mucous – (+++)– (++++)) was conducted in 42 patients with chronic non-atrophic gastritis by two methods: comparative characteristic of urease test data and microscopy Giemsa stained smears, the material for which had been received from a biopsy sample, and the level of natural killer (SD – 16) in the blood. It was found that using the first method intracellular "depot" of the active form of HP infection were detected in 13 (30,9 %), while with the second method – in 38 (90,5 %) patients.

Key words: chronic non-atrophic gastritis, intracellular "depot" of the active forms of H. pylori infection, urease test, microscopy smears – imprints, the level of natural killer cells.

Problem Laboratory for Chronic Helicobacteriosis P. Mohyla Black Sea State University (Mykolaiv)

Рецензент – проф. О.І. Федів

Buk. Med. Herald. – 2016. – Vol. 20, № 4 (80). – P. 3-6

Надійшла до редакції 01.08.2016 року