

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ В.А.Кратасюк
« ____ » _____ 2017 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

**ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ФАГОЦИТОВ КРОВИ У
ДЕТЕЙ С ЭРОЗИВНЫМ ПОРАЖЕНИЕМ ЖЕЛУДКА И 12 ПЕРСТНОЙ
КИШКИ**

06.04.01 «Биология»
06.04.01.07 «Биофизика»

Руководитель _____ д. б. н., профессор О. А. Коленчукова
Выпускник _____ И. С. Литвинова
Рецензент _____ д. м. н., профессор С. Ю. Терещенко

Красноярск 2017

РЕФЕРАТ

Текст 47 с., 18 рис., 6 формул, 51 источник.

ИММУННЫЙ ОТВЕТ, МОНОЦИТЫ, НЕЙТРОФИЛЫ, ЭРОЗИВНО-ЯЗВЕННЫЕ ПОРАЖЕНИЯ, *HELICOBACTERPYLORI*.

Цель работы - выявление закономерностей неспецифического иммунного ответа у детей с *Helicobacter pylori*-ассоциированным эрозивно-язвенным поражением желудка и двенадцатиперстной кишки.

Объектом исследования являются нейтрофильные гранулоциты и моноциты периферической крови детей с *Helicobacter pylori*-ассоциированным эрозивно-язвенным поражением желудка и двенадцатиперстной кишки.

Проведена оценка неспецифического иммунного ответа у детей с *Helicobacter pylori*-ассоциированным эрозивно-язвенным поражением желудка и двенадцатиперстной кишки относительно здоровых

Проведен сравнительный анализ функциональной активности нейтрофилов и моноцитов у детей с *Helicobacter pylori*-ассоциированным эрозивно-язвенным поражением желудка и двенадцатиперстной кишки.

Определена фагоцитарная активность на высокую и низкую обсемененность желудка бактериями *Helicobacter pylori* у детей с *Helicobacter pylori*-ассоциированным эрозивно-язвенным поражением желудка и двенадцатиперстной кишки

Определена фагоцитарная активность при наличии и отсутствии фактора патогенности CagA у *Helicobacter pylori* у детей с *Helicobacter pylori*-ассоциированным эрозивно-язвенным поражением желудка и двенадцатиперстной кишки

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	5
1 Обзор литературы.....	7
1.1. Хемилюминесценция.....	7
1.1.1. Понятие хемилюминесценции.....	7
1.1.2. Применение хемилюминесцентной реакции в медицинской практике. Хемилюминесценция фагоцитов.....	8
1.2. Фагоцитарные клетки периферической крови.....	12
1.2.1. Характеристика и функции нейтрофильных гранулоцитов.....	12
1.2.2. Характеристика и функции моноцитов.....	13
1.3. Патология эрозивно- язвенных поражений.....	15
1.3.1. Эрозивно-язвенные поражения у детей.....	16
1.3.2. Бактерия <i>H. pylori</i> и ее патогенность.....	17
2 Объекты и методы.....	21
2.1 Объекты исследования.....	21
2.2 Методы исследования.....	21
2.2.1 Выделение нейтрофилов и моноцитов из периферической крови.....	21
2.2.2 Проведение хемилюминесцентного анализа фагоцитарных клеток.....	23
2.2.3 Статистические методы исследования.....	24
3 Результаты и их обсуждение.....	25
3.1 Исследования хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов крови группы больных и контрольной группы.....	25
3.2 Исследования сравнительной хемилюминесценции нейтрофилов и моноцитов.....	30
3.3 Исследования хемилюминесценции моноцитов крови при высокой и низкой обсемененности бактериями <i>H.pylori</i>	33
3.4 Исследования хемилюминесценции моноцитов крови у пациентов с анти-CagA иммунным ответом.....	37

Выводы.....	41
Список литературы.....	42

ВВЕДЕНИЕ

Язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки и эрозивные поражения гастродуоденальной зоны у детей представляют серьезную проблему клинической медицины и общества в связи с высоким уровнем распространенности и омоложением патологии. В настоящее время наблюдается утяжеление ее течения с частыми рецидивами, нивелирование сезонности обострений, появление атипичных и бессимптомных форм.

При воспалительном процессе формируется неспецифический иммунный ответ, проявляющийся активацией фагоцитов и являющийся важной составляющей иммунитета. Исследование состояния фагоцитарного звена иммунитета является актуальным направлением в диагностике.

Фагоциты, при воспалении и стрессе, начинают генерировать активные формы кислорода (АФК). На определении активности генерации АФК основан хемилюминесцентный анализ.

Исходя из этого, объектами моего исследования стали нейтрофильные гранулоциты и моноциты периферической крови детей с *Helicobacter pylori*-ассоциированным эрозивно-язвенным поражением желудка и двенадцатиперстной кишки.

Цель исследования – определение активности кислородозависимого фагоцитоза у детей с *Helicobacter pylori*-ассоциированным эрозивно-язвенным поражением желудка и двенадцатиперстной кишки.

В работе поставлены следующие задачи:

1. Оценка кислородозависимого фагоцитоза у детей с *Helicobacter pylori*-ассоциированным эрозивно-язвенным поражением желудка и двенадцатиперстной кишки относительно здоровых с помощью хемилюминесцентного анализа.

2. Сравнительный анализ функциональной активности нейтрофилов и моноцитов у детей с *Helicobacter pylori*-ассоциированным эрозивно-язвенным поражением желудка и двенадцатиперстной кишки с помощью хемилюминесцентного анализа.
3. Определение кислородозависимого фагоцитоза на высокую и низкую обсемененность желудка бактериями *Helicobacter pylori* у детей с *Helicobacter pylori*-ассоциированным эрозивно-язвенным поражением желудка и двенадцатиперстной кишки, с помощью хемилюминесцентного анализа.
4. Определение кислородозависимого фагоцитоза при наличии и отсутствии фактора патогенности CagA у *Helicobacter pylori* у детей с *Helicobacter pylori*-ассоциированным эрозивно-язвенным поражением желудка и двенадцатиперстной кишки, с помощью хемилюминесцентного анализа.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Хемилюминесценция

1.1.1 Понятие хемилюминесценции

Хемилюминесценцией (ХЛ) называется свечение, сопровождающее некоторые биохимические реакции. Клетки и ткани животных обычно излучают свет в процессе своей жизнедеятельности, но такой слабый, что его долгое время не удавалось обнаружить (излучение назвали сверхслабым свечением). Это собственное свечение клеток и тканей обусловлено в основном реакциями с участием свободных радикалов, и его измерение используется в научных исследованиях и в целях лабораторного клинического анализа в тех случаях, когда важно обнаружить и изучить появление свободных радикалов в живых системах. Низкая интенсивность свечения служит, однако, серьезным препятствием для подобных исследований. Низкая интенсивность собственной хемилюминесценции оказалась главным и пока непреодоленным препятствием на пути к ее широкому использованию в аналитических целях. Значительное распространение получило, однако, измерение хемилюминесценции в присутствии определенных соединений, которые в отечественной литературе называют активаторами, а за рубежом - усилителями (enhancer) хемилюминесценции. По механизму действия активаторы распадаются на две четко различающиеся группы - химические и физические [1-3].

Химические активаторы хемилюминесценции - это соединения, вступающие в химические реакции с активными формами кислорода или органическими свободными радикалами, в ходе которых образуются молекулы продуктов в возбужденном электронном состоянии. Наблюдаемое при этом свечение связано с переходом молекул в основное состояние, что приводит к высвечиванию фотонов:



Здесь R - радикал, A - химический активатор, P - ответственный за хемилюминесценцию продукт превращения молекулы активатора в возбужденном (P*) и основном (P_A) электронных состояниях. Хорошо известными представителями таких активаторов могут служить люминол и люцигенин - бис(Т>Г-метилакридиний). Под действием окислителя (в данном случае радикала гидроксила) происходит образование радикала люминола, который затем вступает в реакцию с супероксидным радикалом, образуя внутреннюю перекись (диоксид). Ее разложение приводит к образованию возбужденной молекулы 3-аминофталата. Переход этой молекулы в основное состояние сопровождается испусканием кванта света [4].

Физические активаторы не вступают в химические реакции и не влияют на ход реакций, сопровождающихся свечением, но тем не менее многократно усиливают интенсивность хемилюминесценции. В основе их действия лежит физический процесс переноса (миграции) энергии с молекулы продукта хемилюминесцентной реакции на активатор[2]:



Интенсивность свечения при реакциях хемилюминесценции ($I_{ХЛ}$) зависит от трех параметров: скорости химической реакции, которая сопровождается свечением ($I_{ХЛ}$), вероятности образования молекулы продукта в электронно-возбужденном состоянии (квантовым выходом возбуждения, ϕ_{exc}) и вероятности высвечивания фотона при переходе возбужденной молекулы продукта в основное состояние (квантовый выход люминесценции, ϕ_{lum}) [4]:

$$I_{lum} = I_{ХЛ}^{exc} \phi_{lum} \quad (5)$$

Химические активаторы свечения по существу направляют реакции свободных радикалов в новое русло, поскольку реагируют с радикалами с

образованием возбужденных молекул продуктов этой реакции. Свечение при этом имеет высокую интенсивность, поскольку все три сомножителя в уравнении в этих реакциях довольно велики. Физические активаторы хемилюминесценции (в англоязычной литературе называемые сенсбилизаторами - sensitizers) не влияют на ход химических реакций и увеличивают интенсивность люминесценции за счет физического процесса переноса энергии на молекулу активатора, которая обладает высоким квантовым выходом люминесценции[4].

Иными словами, они увеличивают только величину квантового выхода испускания фотона возбужденной молекулой продукта (τ_{lum}). В обычных реакциях свободных радикалов эта величина довольно мала, всего десятые или даже сотые доли процента, отчего и сама не активированная хемилюминесценция имеет очень низкую интенсивность, и ее часто называют сверхслабым свечением. Но если все молекулы продукта передадут энергию электронного возбуждения на молекулы активатора, то интенсивность свечения будет определяться уже квантовым выходом люминесценции активатора, который в идеале приближается к единице. Интенсивность свечения увеличивается при этом на 3-4 порядка [3]

К физическим активаторам можно отнести некоторые люминесцирующие соединения, применяемые для усиления ХЛ при цепном окислении липидов. Дело в том, что, несмотря на полезность получаемой информации, измерение этой хемилюминесценции пока еще не стало рутинным лабораторным методом в значительной мере из-за ее низкой интенсивности. Поэтому ведется поиск веществ, усиливающих липидную ХЛ. Оказалось, что некоторые красители и комплексы редкоземельных элементов обладают способностью многократно усиливать интенсивность такой хемилюминесценции. Самым эффективным активатором оказалось производное кумарина, применяемое при создании лазеров под названием С-525, которое усиливало хемилюминесценцию, сопровождающую цепное

окисление липидов, более чем в 1500 раз, никак не влияя при этом на ХЛ при взаимодействии радикалов кислорода (гидроксила и супероксида) [2-4].

1.1.2 Применение хемилюминесцентной реакции. Хемилюминесценция фагоцитов

Некоторые клетки организма: гранулоциты и моноциты в крови и тканевые макрофаги - в целях борьбы с чужеродными клетками, такими, как болезнетворные бактерии и грибы, выделяют так называемые активные формы кислорода, к которым относятся супероксидный радикал ($*O_2$), пероксид водорода (H_2O_2), радикал гидроксила ($*OH$). При этом наблюдается очень слабая хемилюминесценция, которая усиливается в тысячи раз в присутствии люминола (или люцигенина). Хемилюминесцентные ответы можно получить, если добавить к лейкоцитам крови суспензию бактерий, изолированные оболочки дрожжевых клеток, кристаллы кварца или сульфата бария, а также определенные химические соединения. Все эти агенты получили собирательное название стимулов. Стимулированная ХЛ клеток в присутствии химических активаторов - ценный показатель функционального состояния фагоцитов крови и тканей, их способности производить при необходимости активные формы кислорода, то есть выполнять свою защитную функцию. Эта способность обычно усиливается при возникновении в организме очагов воспаления и в других случаях [2-4].

Хотя люминесценция люминола и люцигенина - весьма чувствительный метод обнаружения радикалов кислорода, он не очень специфичен. Свечение наблюдается при действии на люминол не только радикалов гидроксила, но и при действии гипохлорита и других окислителей. Заметный вклад в ХЛ-ответ клеток вносит выделение окиси азота: ингибитор NO-синтазы (фермента, катализирующего образование окиси азота в клетках) уменьшает интенсивность свечения нейтрофилов почти вдвое [3].

Большой избирательностью отличается люцигенин, свечение которого происходит при восстановлении красителя супероксидными радикалами. Это соединение часто используют для изучения образования супероксидных радикалов различными клетками и биохимических реакциях в пробирке[4].

1.2 Фагоцитарные клетки периферической крови

1.2.1 Характеристика и функции нейтрофильных гранулоцитов

Основную массу лейкоцитов составляют нейтрофильные гранулоциты. Зрелые клетки этого ряда-сегментоядерные нейтрофильные гранулоциты- подвижные, высокодифференцированные и высокоспециализованные клетки крови, которые тонко реагируют на функциональные и органические изменения в организме, выполняя фагоцитарную и бактерицидную функции [5].

В физиологических условиях нейтрофильные гранулоциты в кровяном русле распределяются на две приблизительно равные части- пристеночный (маргинальный) пул и центральный, находящийся в центре кровотока. При эмоциональном напряжении, после приема пищи, введения ряда гормонов (катехоламинов, глюкокортикостероидов и т.д.) происходит перераспределительный лейкоцитоз, т.е. лейкоциты из маргинального русла поступают в центральный[5,6].

Продолжительность жизни нейтрофильных гранулоцитов в среднем 14 дней, из них 5-6 дней они созревают и задерживаются в синусах костного мозга, от 30 до двух дней циркулируют в периферической крови,6-7 дней находятся в тканях, откуда они уже не возвращаются в кровяное русло [5].

Важнейшие функции нейтрофильных гранулоцитов - способность к фагоцитозу и выработке ряда ферментов, оказывающих бактерицидное действие, а также их способность проходить через базальные мембраны между клетками и перемещаться по основному веществу соединительной ткани. Как фагоцитоз, так и движение гранулоцитов - активные процессы, сопряжённые с энергетическими затратами, которые обеспечиваются благодаря запасам гликогена в организме и наличию гликолитических ферментов в этих клетках. Фагоцитоз НГ является их специфической функцией и осуществляется лишь при созревании клеток. При инволюции

зрелых НГ способность к фагоцитозу почти исчезает. НГ обладают высокой метаболической активностью. Их специфическая зернистость содержит около 35 различных ферментов, способных разрушать основные классы биологических соединений. Вещества, выделяемые гранулоцитами в процессе жизнедеятельности или при разрушении, обладают широким спектром действия. Некоторые из них усиливают метаболическую и двигательную активность клеток, улучшают регенеративные процессы в тканях [5].

Биологическое значение НГ заключается в том, что они доставляют в очаг воспаления большое количество разнообразных протеолитических ферментов, играющих важную роль в процессе рассасывания некротических тканей. Исследования последних лет показали, что гранулоциты могут также выделять в кровь вещества, обладающие бактериальными и антитоксическими свойствами, а также пирогенные вещества, вызывающие лихорадку, и вещества, поддерживающие воспалительный процесс[5,7].

1.2.2 Характеристика и функции моноцитов

В 1839 г. R.Ebert и H.Florey обнаружили, что моноциты из кровяного русла мигрируют в ткани, где превращаются в макрофаги. Провоспалительные, метаболические и инфекционные стимулы существенно усиливают миграцию моноцитов из кровотока. В тканях и органах моноциты превращаются не только в макрофаги, но и в дендритные клетки. Первоначально макрофаги были отнесены к клеткам ретикулоэндотелиальной системы. Но из-за трудности различия между « истинными» синусоидальными эндотелиальными клетками и макрофагами, выстилающими синусы, возникло понятие о моноцитарно- макрофагальной системе, включающей костномозговые предшественники, моноциты и гетерогенную популяцию макрофагов[1,8].

Развитие моноцитов начинается в костном мозге, где последовательно в течение 2-3 дней из стволовых клеток развиваются клетки, образующие гранулоцитарно-макрофагальные колонии, монобласты, промоноциты и моноциты. В сутки из костного мозга в кровяное русло поступают 5 на 10⁸ моноцитов. Моноциты циркулируют в кровяном русле примерно 18 ч. С помощью комплекса механизмов, в котором принимают участие цитокины и адгезивные молекулы, они проникают в различные органы и ткани. Под влиянием внеклеточного матрикса, поверхностных молекул окружающих клеток и их продуктов моноциты дифференцируются в различные типы резидентных макрофагов: клетки Купфера в печени, тканевые макрофаги соединительной ткани, остеокласты костной ткани, микроглия нервной ткани, макрофагальноподобные А-клетки синовиальной оболочки. Макрофаги располагаются в слизистой оболочке желудочно-кишечного, дыхательного и уrogenитального трактов, в интерстициальной ткани сердца, почек, поджелудочной железы, в серозных полостях[9].

Главная функция тканевых макрофагов заключается в контроле за гомеостазом организма. Макрофаги осуществляют освобождение тканей и организма от клеточного дэбриса, избыточных и вредных продуктов метаболизма и апоптопических клеток. Эту функцию макрофаги осуществляют «тихо», без синтеза провоспалительных цитокинов, развития воспалительных реакций и соответственно без повреждения окружающих тканей. Очистительная функция макрофагов важна на всех этапах существования многоклеточного организма, но особенно она важна в эмбриогенезе[9].

1.3 Патология эрозивно-язвенных поражений

Под термином эрозивно-язвенное поражение желудка и двенадцатиперстной кишки (СЭЯПЖидК)» понимают острую или хроническую очаговую деструкцию слизистой оболочки (СО) данных органов, этиологически и патогенетически отличную от язвенной болезни (ЯБ). Симптоматические эрозии и язвы являются одними из местных проявлений патологического состояния организма, возникающих у тяжелых больных на фоне ожогов, тяжелых травм, сепсиса, полисистемной органной недостаточности, геморрагического шока и других критических состояний [10].

Основными патогенетическими механизмами развития эрозивно-язвенного поражения СО служит нарушение взаимодействия факторов агрессии и защиты СО желудка и ДК. Факторы агрессии начинают преобладать над факторами защиты. Стресс, оперативное пособие провоцируют выброс в кровь стрессовых гормонов глюкокортикостероидов и катехоламинов. С одной стороны, происходит стимулированная секреция соляной кислоты как повреждающего агрессивного агента, с другой стороны – снижение факторов защиты на фоне ишемии СО вследствие гипоперфузии, приводящей к дисбалансу окислительных процессов. Также резко снижается активность продукции желудочной слизи как защитного механизма. Более того, восстановление кровообращения после длительной гипоперфузии приводит к неокклюзивному нарушению мезентерального кровообращения, что в еще большей степени усугубляет поражение СО. Система микроциркуляции является фактором, определяющим степень компенсации или декомпенсации метаболических процессов в СО. Результатом ишемии является снижение способности к нейтрализации ионов водорода, что индуцирует массивную гибель клеток и вызывает образование язв. [10,11].

1.3.1 Эрозивно-язвенные поражения у детей

Эрозивный гастродуоденит (ЭГД) - заболевание, сопровождающееся специфической воспалительной структурной перестройкой слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки (очаговой или диффузной), различными секреторными и моторно-эвакуаторными нарушениями и наличием эрозий поверхностных дефектов слизистой оболочки, не проникающих в мышечный слой [12-15].

На фоне патоморфоза эрозивного гастродуоденита в детском возрасте течение данного страдания имеет свои особенности: нередко атипичное, бессимптомное (безболевое) начало, быстрое прогрессирование, приводящее к развитию атрофии слизистой оболочки с явлениями дисплазии, что без сомнения ухудшает прогноз течения болезни и создает в дальнейшем у ряда пациентов старшего возраста риск канцерогенеза. В современных неблагоприятных условиях наметилась отчетливая тенденция к прогрессированию патологического процесса и развитию осложнений заболевания. Нередко ЭГД трансформируется в язвенную болезнь. Убедительно показано, что у 60%-80% взрослых больных формирование эрозивно-язвенного процесса начиналось в детском возрасте. Поэтому остается весьма актуальной проблема адекватного лечения ЭГД у детей. Она переросла в настоящее время из чисто медицинской задачи в острую социальную проблему, что связано как с широкой распространенностью заболевания, так и высокой общей стоимостью лечения, приводящим к значительным затратам в масштабах всей страны [16-19].

ЭГД - циклически протекающее заболевание, при котором рецидив сменяется ремиссией. Длительность каждой фазы зависит от различных факторов, в том числе от отягощенной наследственности, пола, возраста, уровня желудочной секреции, наличия сопутствующих заболеваний, психоэмоционального состояния больного, социальных условий.

Перечисленные факторы диктуют и индивидуальный подход к лечению, особенно в детском возрасте [17].

Согласно современным представлениям, формирование ЭГД происходит при нарушении равновесия между агрессивными свойствами желудочного сока и резистентностью слизистой. Немаловажное значение в патогенезе ЭГД придается нарушениям гормонального гомеостаза, а также иммунной системы. За последнее десятилетие накопилось много исследований о роли инфекционного агента - *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) в этиологии воспалительных состояний, в тоже время патогенез данного страдания раскрыт не до конца [20-27].

1.3.2 Бактерия *H. pylori* и ее патогенность

Helicobacter pylori – это микроаэрофильная, спиралевидная, грамотрицательная бактерия, которая производит различные факторы вирулентности, такие как CagA, VacA, уреазы, а также адгезины, которые обеспечивают адгезию к клетке-хозяину. Синхронизированное взаимодействие факторов вирулентности позволяет *H. pylori* колонизировать и инфицировать эпителий желудка хозяина. Инфицирование организма человека *H. pylori* вызывает ряд побочных эффектов, таких как гастрит, язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, неходжкинская лимфома и аденокарцинома [28].

CagA является наиболее печально известным фактором вирулентности *H. pylori* и признан первым бактериальным онкогеном. Он расположен на островке патогенности cag (cagPAI) – сегменте ДНК размером 40 т.п.н., который также содержит гены системы секреции четвертого типа (T4SS) *H. pylori*. Взаимодействие CagA с внутриклеточными белками-партнерами приводит к некоторым необратимым изменениям в клетках хозяина (увеличение их размера, повышение подвижности клеток), а также возникновению в клетках феномена, известного под названием «фенотип

колибри». CagA также разрушает соединения в апикальном полюсе эпителиальных клеток, и тем самым разрушает нормальную архитектуру эпителия. Сайт фосфорилирования тирозина, называемый EPIYA мотивы, помогает CagA связываться с цитозольными белками фосфорилированно-зависимым образом. Также CagA может взаимодействовать с белками хозяина фосфорилированно-независимым способом, что в совокупности способствует развитию аденокарциномы в инфицированных клетках[28].

С открытием в слизистой оболочке желудка микроорганизма *H. pylori* (1983) начался новый этап в развитии представлений об этиологии, патогенезе заболеваний желудка и двенадцатиперстной кишки. Доказано непосредственное участие бактерии в развитии хронических гастритов, язвенной болезни. Длительное персистирование бактерии на слизистой оболочке желудка, помимо развития воспалительных, способствует формированию атрофических изменений, появлению кишечной метаплазии и, как следствие, канцерогенезу [29-30].

Среди всех инфекционных агентов, ассоциированных с онкологической патологией, *H. Pylori* стоит на первом месте. В развитых странах распространенность *H. Pylori* значительно ниже и составляет среди взрослого населения Западной Европы и Северной Америки не более 30%. Аналогичная ситуация прослеживается и среди детского населения данных территорий. Низкая инфицированность у детей зарегистрирована в Нью-Йорке – 3,8%, в немецком городе Лейпциг – 6,5%, во Франции – 10,7%. В нашей территориально обширной стране актуально влияние климато-экологических условий проживания на формирование патологии гастродуоденальной зоны, и, в частности, на ассоциацию с ней бактерии *H. pylori*. Важной особенностью данного вопроса является то, что Россия территориально расположена и в Европе, и в Азии, с компактным проживанием в последней европеоидов (пришлые жители) и монголоидов (коренные жители). В европейской части России, по последним данным, инфекционный агент встречается очень часто: в Москве в 88%, в Северо-

Западном федеральном округе в 63,6%. В азиатской части России показатели обсемененности бактерией взрослого и детского населения не отличаются. Хеликобактерная инфекция выявлена у 78-88% жителей Якутии и г. Новосибирска, у 80% населения Ямало-Ненецкого автономного округа, у 86,5% пришлого и у 85,4% коренного населения Хакасии, у 88,4% коренных жителей Тывы [31-41].

Одним из ведущих путей передачи бактериальной инфекции является фекальнооральный; следовательно, высокие показатели наличия *H. pylori* слизистой оболочке желудка говорят, прежде всего, о достаточно низком уровне санитарно-гигиенического и социального обеспечения населения в странах с высокой инфицированностью *H. pylori*. Важным моментом трансмиссии бактерии является возможность ее передачи водным путем. Так, например, имеется сообщение о том, что *H. pylori* обнаружена в питьевой воде [42].

При изучении *H. pylori*-ассоциированной патологии желудка и двенадцатиперстной кишки у детского населения Сибири получены данные, показывающие аналогичные популяционные закономерности в распространенности деструктивных поражений слизистой гастродуоденальной зоны, что и у взрослых. По данным некоторых авторов ассоциация бактерии с эрозивными заболеваниями желудка и ДПК, а также язвенной болезнью в детском возрасте, в отличие от взрослых, прослеживается не столь отчетливо. Не исключено, что на фоне высокого инфицирования *H. pylori* большей степени просматривается влияние других факторов, роль многих из которых в формировании заболеваний органов пищеварения доказана, а их воздействие усугубляет течение воспалительного процесса в слизистой желудка, инициированного инфекцией. В качестве таких факторов может выступать дефицит обеспеченности организма белком, столь необходимым для регенерации эпителия слизистой, поддержания слизистого барьера желудка и иммунитета на необходимом уровне, что особо

актуально для растущего детского организма и при наличии деструктивных повреждений слизистой гастродуоденальной зоны [43-48].

Существует положение, что субстратом деструктивных заболеваний желудка являются воспалительные изменения слизистой. В Тыве при морфологическом исследовании гастрит установлен у всех обследованных школьников, в том числе значительно чаще был диагностирован высокоактивный гастрит (2-3 степень активности) одновременно при их меньшем инфицировании, в отличие от детей северных регионов, у которых не во всех случаях определялись воспалительные изменения в слизистой и активность гастрита была ниже при их большем инфицировании *H. Pylori*. Рассматривая *H. pylori*-ассоциированный гастрит, как локальный иммунный ответ на микроорганизм, можно предположить, что одной из причин наблюдающегося несоответствия между инфицированностью *H. pylori* и воспалительными изменениями в слизистой желудка у детей Сибири являются различия иммунного ответа на инфекцию в разных климатоэкологических условиях [49-51].

2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объекты исследования

Объектами исследования служили нейтрофильные гранулоциты и моноциты крови, выделенные у 46 лиц с *H. pylori*-ассоциированным эрозивно-язвенным поражением желудка и 12-перстной кишки в возрасте от 11 до 18 лет и у 55 практически здоровых лиц, у которых было исключено эрозивно-язвенное поражение желудка и 12-перстной кишки в аналогичном возрастном диапазоне.

Для постановки диагноза использовались традиционные методы клинического обследования (анализ жалоб, сбор анамнеза, данные общего осмотра), методы лабораторной диагностики (клинический анализ крови, мочи, биохимический анализ крови). Кроме этого, применялись специализированные инструментальные методы— *эзофагогастродуоденоскопия* (ЭГДС), ультразвуковое исследование органов брюшной полости, дыхательный уреазный карбамид-тест с использованием системы Хелик-тест для верификации *H. pylori*. Для определения специфического *H. pylori*-антигена был использован stool test (в кале с помощью моноклональных антител) гистологическое исследование биоптата и регистрации специфических антител в плазме крови ИФА.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Выделение нейтрофилов и моноцитов из периферической крови

Забор крови для исследования проводили утром натощак с 8 до 9 часов. Выделение общей фракции моноцитов и нейтрофилов осуществляли по

общепринятому методу в градиенте плотности фиколл-верографина с последующей очисткой от прилипающих клеток. Количество клеток подсчитывали в камере Горяева. При контроле морфологического состава лейкоцитарных взвесей определялась чистота выхода нейтрофилов и моноцитов, которая составляла не менее 97%, жизнеспособность клеток соответствовала 98-100%. В дальнейшем 1 млн. выделенных клеток использовали для определения хемилюминесцентной активности.

Порядок выполнения работы:

1. Используют фиколл-верографин $\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$ и $\rho = 1,119 \text{ г/см}^3$. Вначале создают двойной градиент фиколл-верорографина: первым в пробирку вносят раствор фиколл-урографина, имеющий плотность $\rho = 1,119 \text{ г/см}^3$, затем на него аккуратно наслаивают раствор фиколла с плотностью $\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$.
2. Гепаринизированную кровь наслаивают на двойной градиент фиколл-верорографина, центрифугируют 45 мин при 1500 об. После центрифугирования получают кольца моно- нуклеарных клеток (верхнее) и нейтрофилов (нижнее), а в осадке находятся эритроциты. Полученные кольца мононуклеарных клеток и нейтрофилов отбирают в чистые центрифужные пробирки.

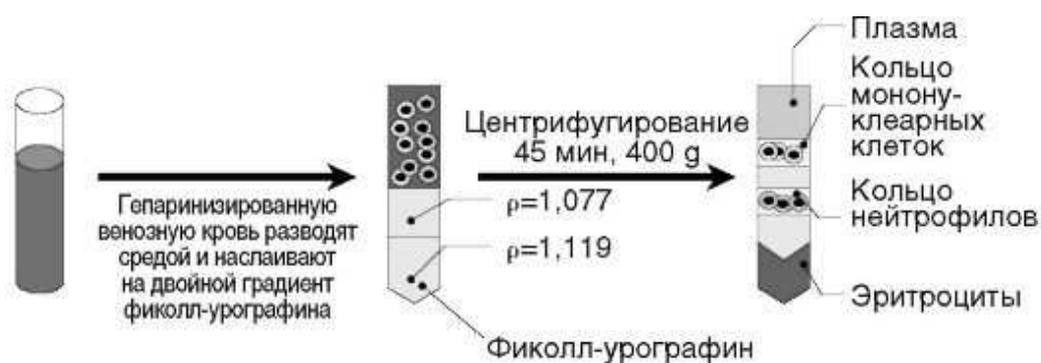


Рис.1. Выделение мононуклеарных клеток и нейтрофилов с помощью градиента плотности фиколл-верографина.

3. Добавляют физиологический раствор превосходящим объемом и центрифугируют 5 мин при 1500 об. Все клетки оседают на дно, смыв супернатанта.
4. Добавляют 1 мл. раствора Хэнкса в кювету с нейтрофилами. Клетки готовы к исследованию в течении 2 часов
5. Добавляют 3 мл среды RPMI в кювету с моноклеарными клетками. Далее данную смесь переносят на пластиковую чашку Петри и инкубируют 1 час при 37 °С.
6. После инкубирования моноклеарных клеток, среда RPMI заменяется на раствор Версена и инкубируется 20 мин при 4°С.
7. Раствор Версена с моноцитами переливают в пробирку и добавляют 9 мл. физиологического раствора. Центрифугируют 5 мин при 1500 об.
8. После центрифугирования моноциты оседают на дно пробирки, сливают супернатант. Добавляют 1 мл раствора Хэнкса. Клетки готовы к исследованию в течении 2 часов.

2.2.2 Проведение хемилюминесцентного анализа фагоцитарных клеток

Реакционная смесь для хемилюминесцентной реакции состояла из 20 мкл донорской сыворотки AB(IV)Rh(-), 50 мкл люминола или люцигенина (“Sigma”, США) в концентрации 10^{-5} М, 40 мкл опсонизированного зимозана (в случае определения индуцированной хемилюминесценции), 200 мкл взвеси нейтрофилов (2 млн/мл) и 240 мкл раствора Хэнкса (“ПанЭко”, Россия) для определения спонтанной хемилюминесценции или 200 мкл раствора Хэнкса – для индуцированной. Оценку спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции осуществляли в течение 90 минут на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе «CL3606M» (СКТБ “Наука”, Красноярск).

Результаты ХЛ анализа характеризовали по следующим параметрам: время выхода на максимум интенсивности ХЛ, значение максимума интенсивности ХЛ, площадь под кривой ХЛ. Определили индекс чувствительности хемилюминесценции (ИА)- отношением площади кривой хемилюминесценции индуцированной зимозаном к спонтанной хемилюминесценции. Индекс активации определяли по формуле:

$$ИА = S_{\text{индуцированная}} / S_{\text{спонтанной,...}} \quad \dots(6)$$

$S_{\text{индуцированная}}$ – величина площади под кривой хемилюминесценции индуцированной зимозаном (относительных единиц).

$S_{\text{спонтанная}}$ – величина площади под кривой хемилюминесценции не индуцированная(относительных единиц);

2.2.3 Статистические методы исследования

По результатам исследования в пакете электронных таблиц MSExcel 2010 была сформирована база данных, на основе которой с помощью пакета прикладных программ и Statistica 8,0 производился статистический анализ. Выборку описывали с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей (C_{25} и C_{75}). Достоверность различий между показателями контрольной и опытных групп оценивали по непараметрическому критерию Mann-Whitney и Вилкоксона. Результаты статистической обработки использованы в рисунках.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проделанной работы были получены результаты, которые представлены на графиках. Уровень статистической значимости данных результатов является достоверным ($p < 0,05$).

3.1 Исследования хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов крови группы больных и контроля

Проведено исследование показателей люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов крови при *H.pylori*-ассоциированном эрозивно - язвенном поражении желудка и 12-перстной кишки относительно контрольной группы.

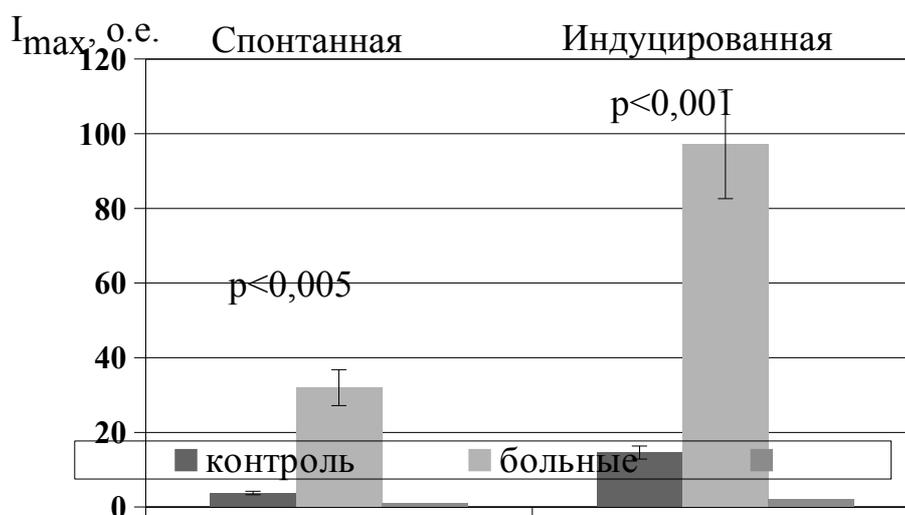


Рис.2. Интенсивность реакции (I_{max}) люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови при спонтанной и индуцированной реакции группы больных и контрольной группы.

Получены следующие результаты: в спонтанном и зимозан-индуцированном люминол-зависимом процессе интенсивность хемилюминесценции нейтрофилов в группе больных значительно выше

контрольного диапазона (рис.2). Площадь под кривой люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов крови при спонтанной и индуцированной реакции также увеличена в группе больных относительно контрольной группы (рис.3).

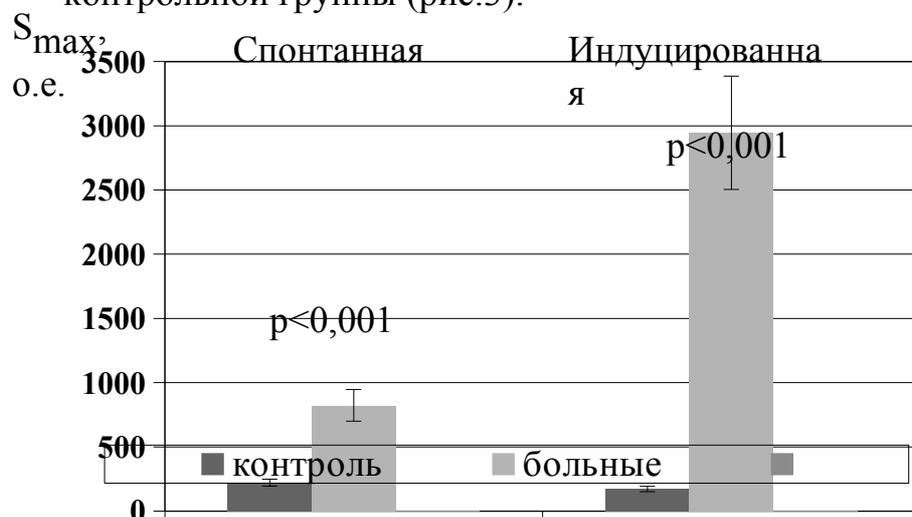


Рис.3. Площадь под кривой (S_{max}) люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови при спонтанной и индуцированной реакции группы больных и контрольной группы.

Индекс активации люминол-зависимого процесса нейтрофильных гранулоцитов крови, характеризующий отношение зимозан-индуцированной хемилюминесценции к спонтанной снижен в группе больных относительно контроля (рис.4).

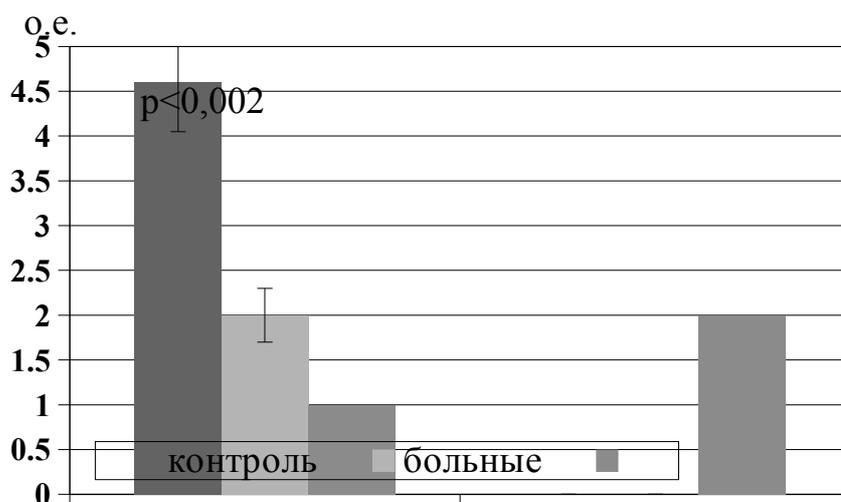


Рис.4. Индекс активации люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови группы больных и контрольной группы.

Таким образом при люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови (в спонтанной и зимозан-индуцированной реакции) в группе больных наблюдалось значительное увеличение генерации АФК по сравнению с контролем, что выражалось в увеличении интенсивности и площади под кривой хемилюминесцентной реакции. Индекс активации в группе больных достоверно снижался в результате истощения резервных возможностей клеток.

Проведено исследование показателей люминол- и люцигинин-зависимой хемилюминесценции моноцитов крови при *H.pylori*-ассоциированном эрозивно - язвенном поражении желудка и 12-перстной кишки относительно контрольной группы.

Исследование люминол-зависимой хемилюминесценции моноцитов крови показало повышение времени выхода на пик у контрольной группы относительно группы больных с высокой обсемененностью бактериями *H. pylori* при спонтанной и индуцированной реакции (рис.5).

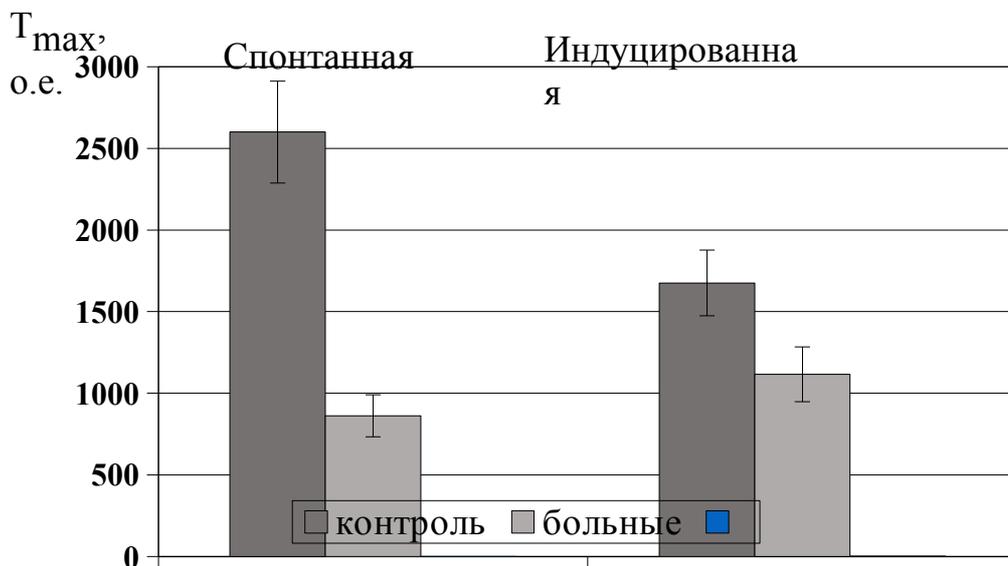


Рис.5. Время достижения I_{max} (T_{max}) люминол-зависимой хемилюминесценции моноцитов крови при спонтанной и индуцированной реакции группы больных и контрольной группы.

Исследование люцигинин-зависимой хемилюминесценции моноцитов крови показало повышение времени выхода на пик у контрольной группы относительно группы больных с высокой обсемененностью бактериями *H. pylori* при спонтанной реакции (рис.6). Площадь под кривой также значительно больше у моноцитов контрольной группы относительно группы больных(рис. 7).

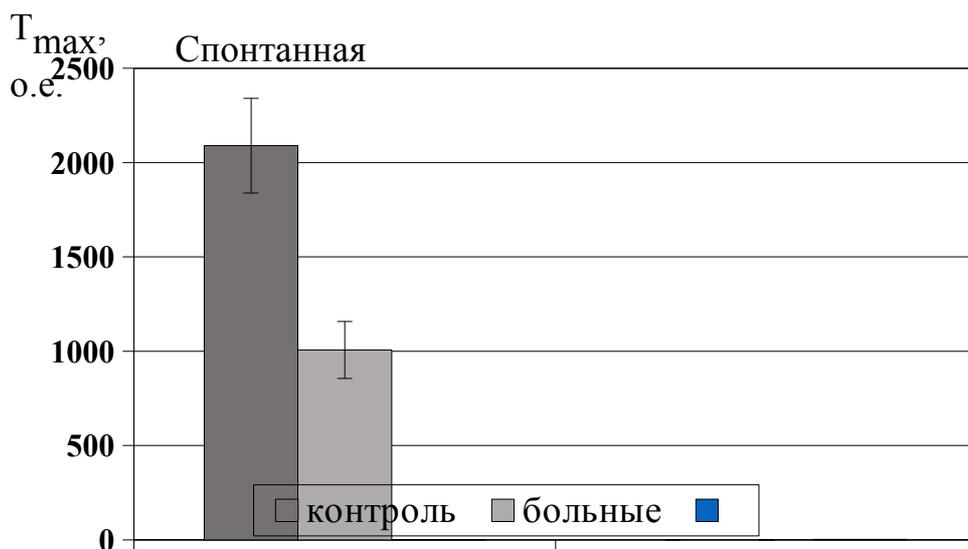


Рис.6. Время достижения I_{max} (T_{max}) люцигинин-зависимой хемилюминесценции моноцитов крови при спонтанной реакции группы больных и контрольной группы.

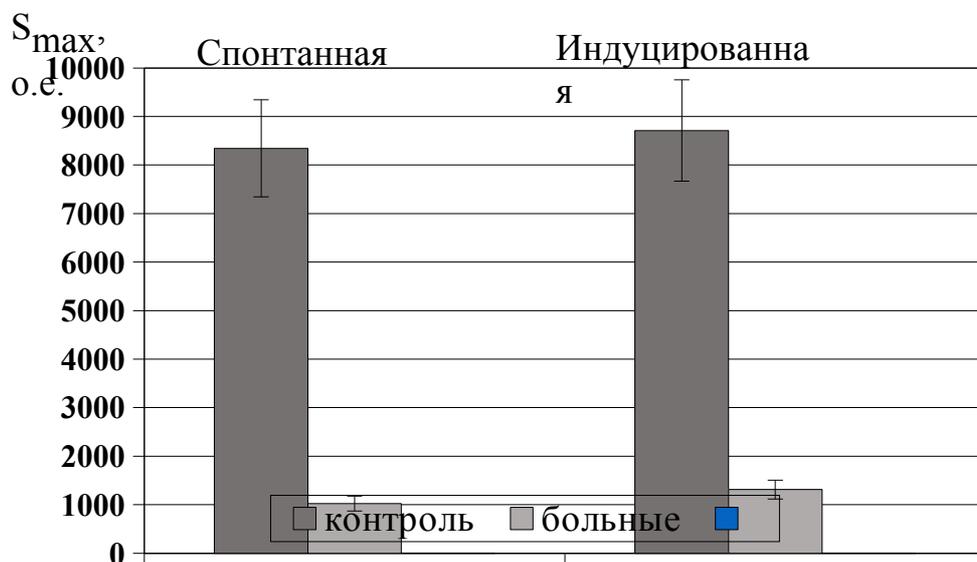


Рис.7. Площадь под кривой (S_{max}) люцигинин-зависимой хемилюминесценции моноцитов крови при спонтанной и индуцированной реакции группы больных и контрольной группы.

3.2 Исследования хемилюминесценции нейтрофилов и моноцитов

Проведено сравнительное исследование показателей люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов и моноцитов крови при *H. pylori*-ассоциированном эрозивно - язвенном поражении желудка и 12-перстной кишки.

Интенсивность реакции нейтрофилов в спонтанном процессе и при индукции зимозаном повышена относительно моноцитов крови. В нейтрофилах на фоне базовой повышенной функциональной активности дополнительная стимуляция реакции зимозаном приводит к соответствующему увеличению продукции АФК, что отражает повышенные резервные метаболические возможности данной клеточной популяции у больных (рис.8).

Площадь под кривой нейтрофильных гранулоцитов в люминол-зависимом процессе снижена относительно общей фракции моноцитов крови (рис.9).

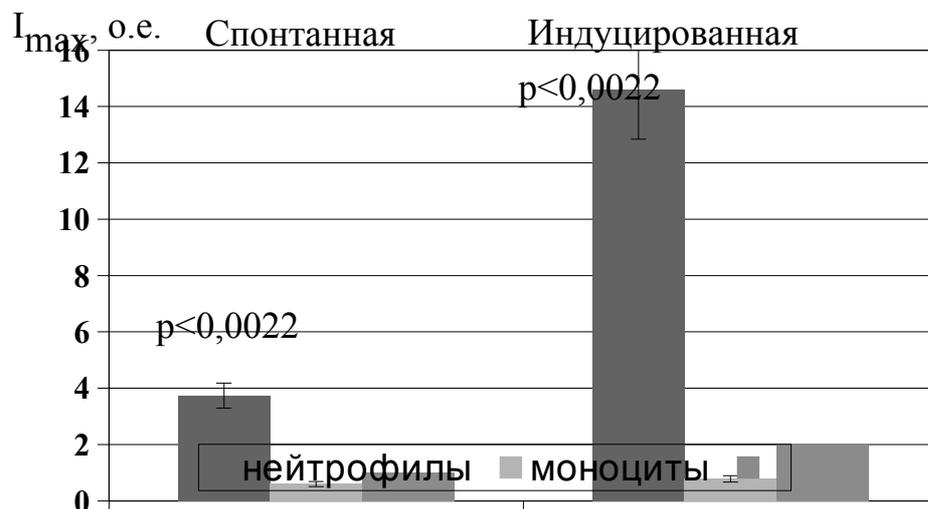


Рис.8. Интенсивность реакции (I_{max}) люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов и моноцитов крови больных при спонтанной и индуцированной реакции.

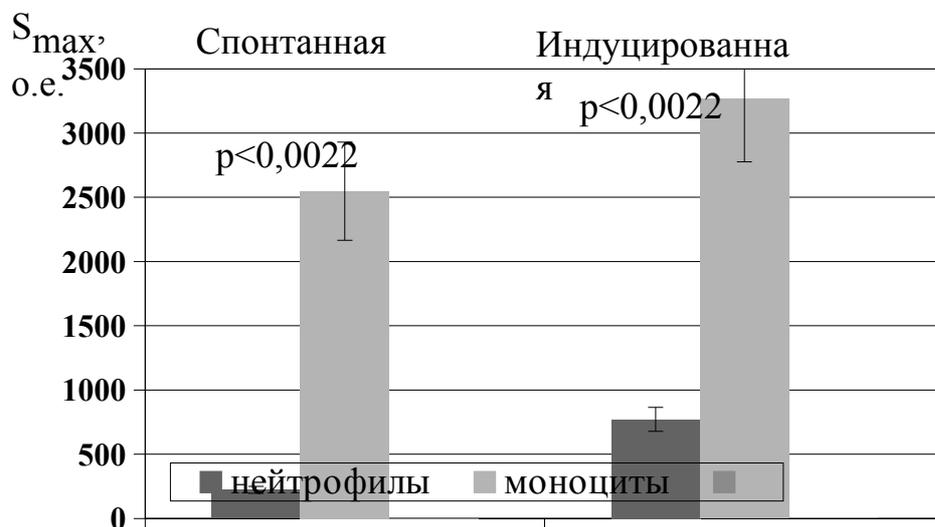


Рис.9. Площадь под кривой (S_{max}) люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов и моноцитов крови больных при спонтанной и индуцированной реакции.

Таким образом сравнительное изучение функциональной активности общей фракции нейтрофилов и моноцитов крови у больных с *H. pylori*-ассоциированным эрозивно-язвенным поражением желудка и 12-перстной кишки показало увеличение интенсивности выработки общего пула вторичных радикалов кислорода у нейтрофилов, при этом площадь под кривой снижена относительно общей фракции моноцитов крови. Это связано с функциональной особенностью моноцитов. АФК в моноцитах крови вырабатываются медленнее, а также очень медленно расходуются, чем в нейтрофилах.

Также, проведено сравнение показателей хемилюминесценции нейтрофилов и моноцитов крови, при *H. pylori*-ассоциированном эрозивно-язвенном поражении желудка и 12-перстной кишки, в ходе которой химическим активатором являлся люцигенин.

В люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов и моноцитов крови больных при спонтанной и индуцированной реакции обнаружено повышение интенсивности и площади под кривой в нейтрофильных гранулоцитах относительно моноцитов крови (рис.10,11).

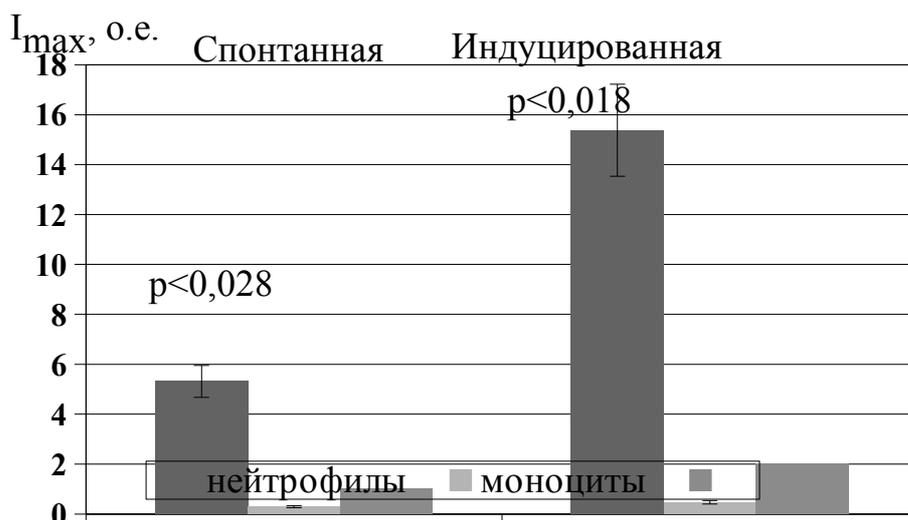


Рис.10. Интенсивность реакции (I_{max}) люцигинин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов и моноцитов крови больных при спонтанной и индуцированной реакции.

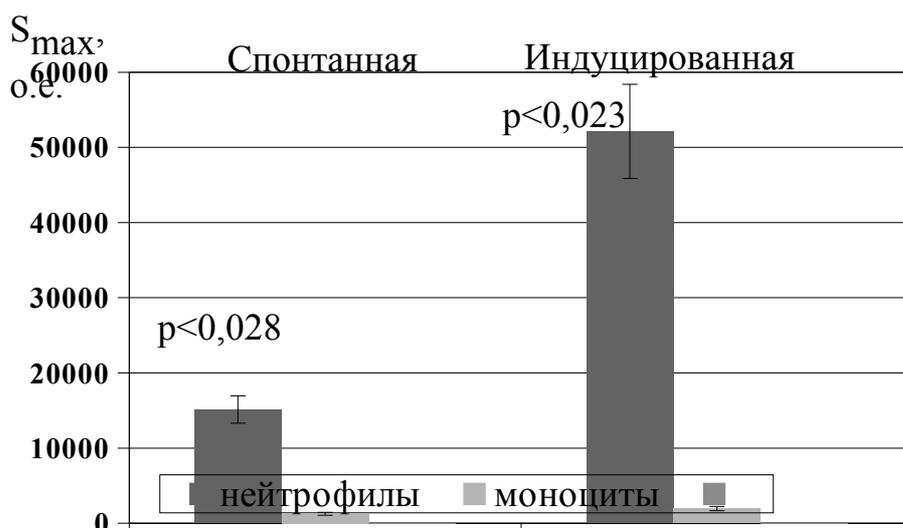


Рис.11. Площадь под кривой (S_{max}) люцигинин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов и моноцитов крови больных при спонтанной и индуцированной реакции.

При этом индекс активации нейтрофильных гранулоцитов значительно повышен у нейтрофилов относительно моноцитов крови, что отражает отражает повышенные резервные метаболические возможности данной клеточной популяции у больных (рис.12).

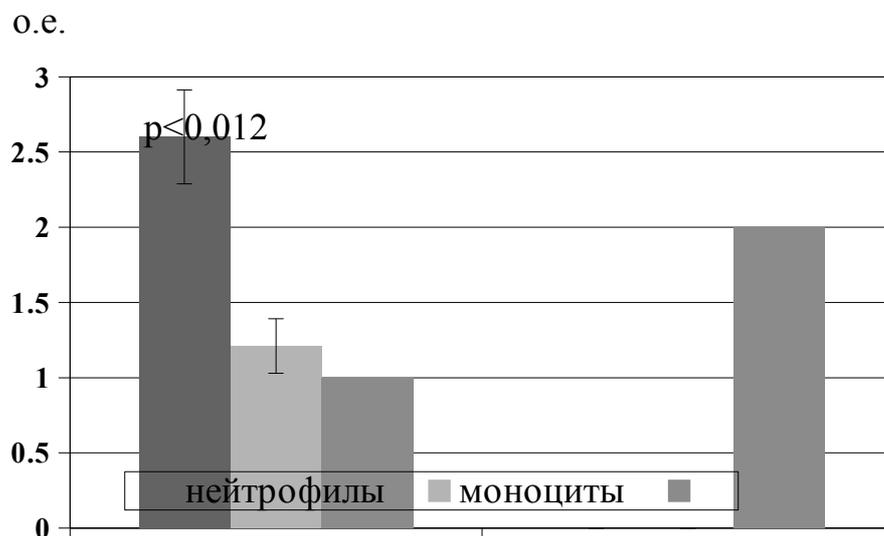


Рис.12. Индекс активации люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов и моноцитов крови больных.

Таким образом при исследовании люцигенин-зависимой хемилюминесценции фагоцитов крови (спонтанной и зимозан-индуцированной) у больных *H. pylori*-ассоциированном эрозивно - язвенном поражении желудка и 12-перстной кишки обнаружили значительное увеличение генерации первичных АФК нейтрофилов по сравнению с моноцитами крови, что выражалось в увеличении интенсивности хемилюминесцентной реакции, площадь под кривой и индекса активации.

3.3 Исследования хемилюминесценции моноцитов крови при высокой и низкой обсемененности бактериями *H.pylori*

Проведено исследование показателей хемилюминесцентной реакции моноцитов крови у детей с эрозивно– язвенным поражением желудка и 12-перстной кишки ассоциированной с низкой и высокой обсемененность бактериями *Helicobacter pylori*.

В результате микроскопического исследования биоптатов слизистой оболочки желудка (СОЖ) из стандартных зон и краев язвенных дефектов (световая микроскопия, окраска общепринятым методом по Романовскому–Гимзе и азур-эозином) были выделены 2 группы больных с эрозивно–

язвенным поражением желудка и 12-перстной кишки: 1 группа – наличие высокой степени обсемененности бактериями *Helicobacter pylori* 50% и 2 группа – низкая степень обсемененности 50%. Сравнительное изучение фагоцитарной активности моноцитов крови проведено в группах с высокой и низкой обсемененностью бактериями *Helicobacter pylori*.

Определение функциональной активности моноцитов крови включало в себя оценку кислородзависимой системы фагоцитоза в виде определения хемилюминесцентной активности клеток.

При высокой обсемененности наблюдается значительное повышение интенсивности в спонтанной люминол-зависимой хемилюминесценции относительно пациентов с низкой обсемененностью (рис.13).



Рис.13. Интенсивность реакции (I_{max}) люминол-зависимой хемилюминесценции моноцитов крови больных с высокой и низкой обсемененностью бактериями *H. pylori* при спонтанной реакции.

Также площадь под кривой в спонтанном и зимозан-индуцированном процессе значительно повышена у больных с высокой обсемененностью бактериями *H. pylori* относительно группы с низкой обсемененностью (рис.14).

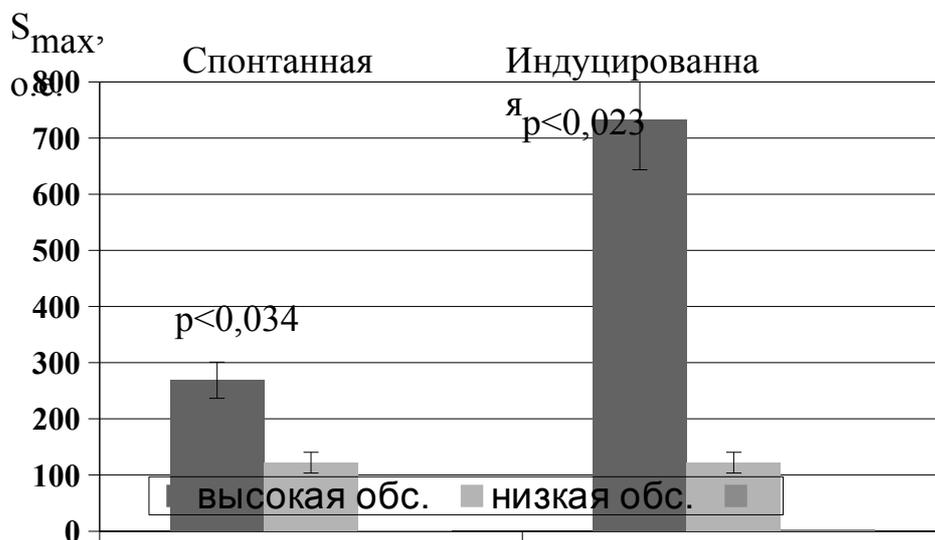


Рис.14. Площадь под кривой (S_{max}) люминол-зависимой хемилюминесценции моноцитов крови больных с высокой и низкой обсемененностью бактериями *H. pylori* при спонтанной и индуцированной реакции.

Исследование люцигенин-зависимой хемилюминесценции моноцитов крови показало повышение времени выхода на пик у больных с высокой обсемененностью бактериями *H. pylori* относительно группы с низкой обсемененностью при спонтанной и индуцированной реакции (рис.15).

При этом индекс активации люцигенин-зависимой хемилюминесценции моноцитов крови больных при высокой обсемененности бактериями был повышен относительно группы с низкой обсемененностью (рис.16).

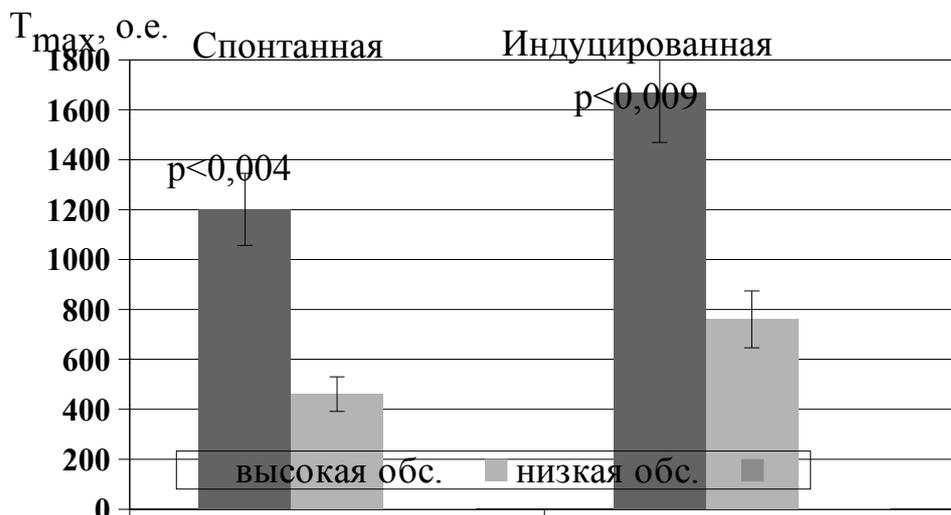


Рис.15. Время достижения I_{max} (T_{max}) при люцигенин-зависимой хемилюминесценции моноцитов крови больных с высокой и низкой обсемененностью бактериями *H. pylori* при спонтанной и индуцированной реакции.

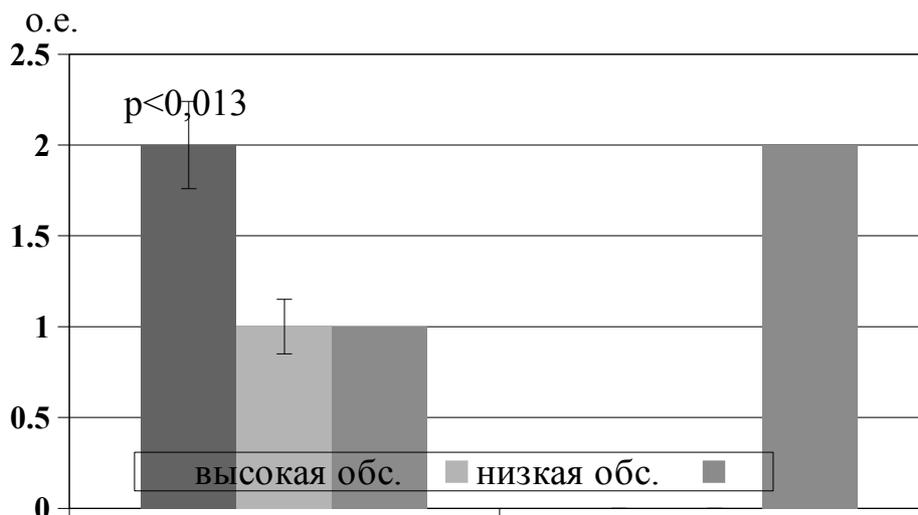


Рис.16. Индекс активации люцигенин-зависимой хемилюминесценции моноцитов крови больных с высокой и низкой обсемененностью бактериями *H. pylori*.

3.4 Исследования хемилюминесценции моноцитов крови с анти-CagA иммунным ответом

Дальнейшим этапом эксперимента было выявление CagA-позитивных штаммов *Helicobacter pylori* в группе с высокой степенью обсемененности у детей с эрозивно-язвенным поражением желудка и 12-перстной кишки. Гистологическая картина СОЖ у детей с анти-CagA антителами характеризуется более тяжелой степенью деструкции слизистой оболочки, более выраженные признаки воспаления (в первую очередь тяжелую степень нейтрофильной инфильтрации, а также наличие лимфоидных фолликулов) в сравнении с серонегативными пациентами. Цитотоксин-ассоциированный ген CagA был одним из первых токсинов *Helicobacter pylori*, с которым связывали его патогенность. CagA - продукт одного из генов «островка патогенности» *Helicobacter pylori*.

Проведено исследование показателей люминол- и люцигенин-зависимой спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесцентной реакции моноцитов крови у детей с язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки, ассоциированной с *Helicobacter pylori* с анти-CagA серологическим иммунным ответом.

Время выхода на пик выше в группе с CagA+ *Helicobacter pylori* относительно CagA- , при люминол- и люцигенин- зависимой спонтанной реакции (рис.17).

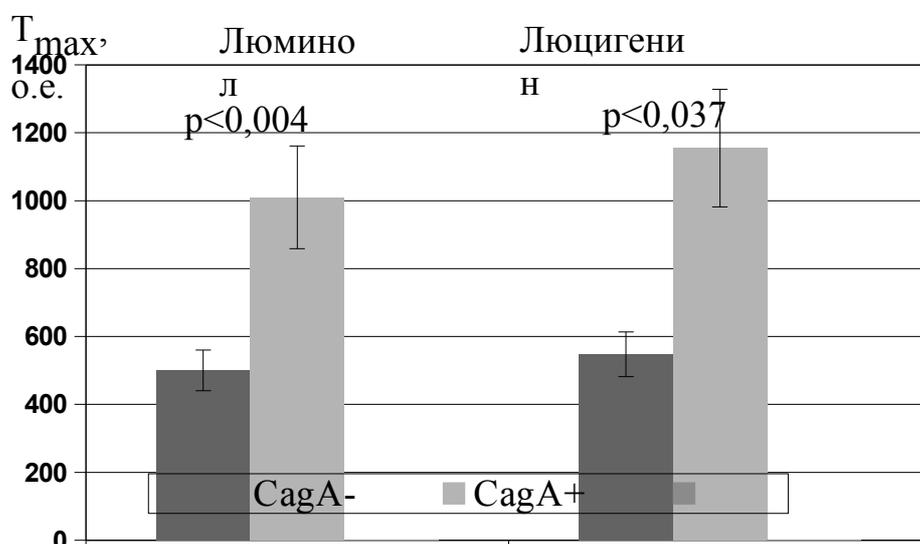


Рис.17. Время достижения I_{\max} (T_{\max}) при люминол- и люцигенин-зависимой хемилюминесценции моноцитов крови больных *Helicobacter pylori* с анти-CagA серологическим иммунным ответом при спонтанной реакции.

Интенсивность продукции АФК при люминол- и люцигенин-зависимой спонтанной хемилюминесценции моноцитов крови у больных CagA+ *Helicobacter pylori* наблюдалась значительно выше относительно CagA- (рис.18).

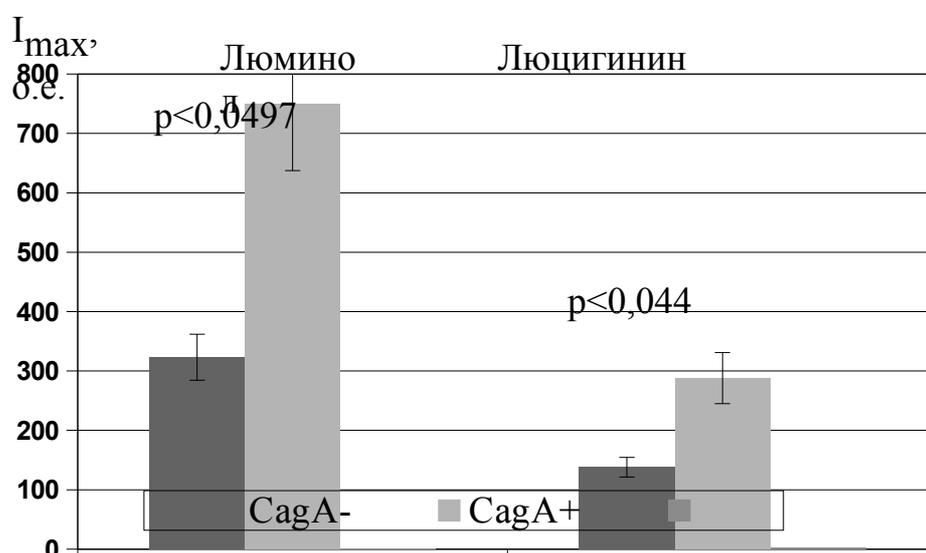


Рис.18. Интенсивность реакции (I_{\max}) при люминол- и люцигенин-зависимой хемилюминесценции моноцитов крови больных *Helicobacter pylori* с анти-CagA серологическим иммунным ответом при спонтанной реакции.

В целом можно отметить, что у больных с *H. pylori*-ассоциированным эрозивно–язвенным поражением желудка и 12-перстной кишки наблюдается различная активация фагоцитов. Обнаружено, что в спонтанном процессе и при индукции «респираторного взрыва» активность НАДФН-оксидазы увеличивается в нейтрофилах и снижается в моноцитах. Также в нейтрофилах увеличивается величина индекса активации в люцигенин-зависимой хемилюминесценции, которая характеризует уровень метаболических резервов для синтеза соответствующих активных форм кислорода.

Цитотоксическая активность фагоцитов определяется уровнем продукции как первичных, так и вторичных активных форм (гидроксильный радикал, перекись водорода и др.) кислорода. В люминол-зависимом процессе снижение площади под кривой моноцитов крови относительно нейтрофильных гранулоцитов определяет пониженный уровень «респираторного взрыва», что в целом характеризует недостаточность цитотоксической активности моноцитов по сравнению с нейтрофилами у больных с *H. pylori*-ассоциированного эрозивно–язвенного поражения желудка и 12-перстной кишки. Также, выявлено увеличение продукции АФК моноцитов крови у больных с высокой степенью обсемененности СОЖ бактериями *H. pylori*, при этом у нейтрофильных гранулоцитов не выявлено выраженной реакции на степень обсемененности *H. pylori*, подобная картина наблюдалась при исследовании патогенности *H. pylori*, в группе больных с анти-CagA антителами обнаружено повышение функциональной активности моноцитов крови при отсутствии реакции нейтрофильных гранулоцитов.

ВЫВОДЫ

1. У детей больных *Helicobacter pylori*-ассоциированным эрозивно-язвенным поражением желудка и двенадцатиперстной кишки наблюдается интенсификация кислород-зависимого фагоцитоза нейтрофильных гранулоцитов относительно здоровых лиц.
2. У детей больных *H. pylori*-ассоциированным эрозивно-язвенным поражением желудка и двенадцатиперстной кишки наблюдается различная активность фагоцитов. Обнаружено, что нейтрофильные гранулоциты обладают большими метаболическими резервами для синтеза первичных и вторичных активных форм кислорода.
3. При высокой обсемененности СОЖ бактериями *Helicobacter pylori*, у детей с *Helicobacter pylori*-ассоциированным эрозивно-язвенным поражением желудка и двенадцатиперстной кишки, наблюдается увеличение продукции АФК моноцитами, что характеризует интенсификацию функциональной активности моноцитов крови.
4. Кислородозависимый фагоцитоз при наличии фактора патогенности CagA у *Helicobacter pylori* у детей с *Helicobacter pylori*-ассоциированным эрозивно-язвенным поражением желудка и двенадцатиперстной кишки, идет интенсивнее, чем при отсутствии данного фактора патогенности. При этом наблюдается активация вторичных радикалов кислорода.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авзалетдинова, А.Р. Хемилюминесценция крови и мочи у больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом /А.Р. Авзалетдинова, Р.Р. Фархутдинов, Р.М. Фазлыева // Здравоохранение Башкортостана. - 1994. - №4. - С. 36-39.
2. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты / Ю.А. Владимиров // Вестн. РАМН. - 1998. - №7. - С. 43-51.
3. Дамбаева, С.В. Оценка продукции активных форм кислорода методом лазерной проточной цитометрии в клетках периферической крови человека / С.В. Дамбаева, Д.В. Мазуров, Б.Г. Пинегин // Иммунология.- 2001. - №6. - С. 58-60.
4. Демин, Д.Б. Прогностическое значение содержания продуктов липопероксидации в тканях при панкреонекрозе / Д.Б. Демин, В.С. Тарасенко, Д.В. Волков // Вестник хирургии. - 2003. - Том 162. - №5. - С. 47-50.
5. Ройт А. Основы иммунологии // М. 1991г., с. 10 - 18.
6. Ройт А., Д. Бростофф, Д.Мейл // Иммунология 2000 г. с. 48 - 54.
7. Хайтов Р.М., Иммунология// М. 2000г., том3. с. 61 - 67.
8. Абелев Г.И. Воспаление // Соросовский образовательный Журнал. 1996 г. , №10.с. 28 - 32.
9. Пинегин Б.В., Карсанова М.И. Макрофаги : свойства и функции // Иммунология 2009 г. , №6 с. 241 - 242, 246 - 247.
10. Скрябин О.Н, Асанов О.Н. Патогенез острых язв пищеварительного канала при послеоперационных гнойно-септических осложнений. //Клиническая хирургия. 1990. №8. с.11-13.
11. Kivilaakso E., Silen W. Pathogenesis of experimental gastric-mucosal injury. M. Engl. J. Med. 1979;301:364-9.
12. Баранов А.А. Актуальные вопросы детской гастроэнтерологии. / А.А. Баранов, П.Л. Щербаков II Вопр. совр. педиатрии. 2002. - Т. 1, № 1 - С. 12-16.

13. Беспалов А.П. Врачебная тактика при гастродуоденальных кровотечениях / А.П. Беспалов // Язвенная болезнь: современные представления об этиологии, диагностике и лечении: Сб. науч. тр. -М., 1990. С. 139-143.
14. Gutthann S.P. Individual nonsteroidal anti-inflammatory drugs and other risk factors for upper gastrointestinal bleeding and perforation /S.P. Gutthann, L.A. Garcia-Rodriguez, D.S. Raiford // Epidemiology. -1997-Vol. 8.-P. 18-24.
15. Identification, characterization, and spatial localization of two flagellin species in Helicobacter pylori flagella / M. Kostrzynska, J. D. Betts, J. W. Austin et al. // J. Bacteriol. 1991. - Vol. 173, № 3. -P.937-946.
16. Low rate of emergence of claritromycin resistant Helicobacter pylori with amoxicillin co - therapy / L. Laine, L. Suchower, J. Frantz et al. // Aliment. Pharmacol. Ther. - 1998. - Vol. 12, № 9. - P. 887-892.
17. Sacco R. Epidemiological behavior of perforated peptic ulcer before and after the introduction of the antisecretory drug therapy. Our experience / R. Sacco, A. Giovanelli, L. Giuliano // Minerva. Chir. -1995. Vol. 50. - P. 871-878.
18. Baskerville A. Naturally occurring chronic gastritis and Campylobacter pylori infection in the Rhesus monkey: a potential model for gastritis in man / A. Baskerville, D. Newell // Gut. 1988. - Vol. 29, N 4. - P. 465-472
19. Bernersen, R. Johnsen, B. Straume, P.G. Burhol // Scand. J. Gastroenterol. 1992. - Vol. 27, N 3. - P. 233-237.
20. Баранов А.А. Состояние здоровья детей и задачи Союза педиатров России / А.А. Баранов // Педиатрия. 1995. - № 4. - С. 7-11.
21. Белобородова Э.И. Функциональные заболевания желудочно-кишечного тракта / Э.И. Белобородова // Бюл. сиб. мед. 2002. -№ 1. - С. 52-54.
22. Мазурин А.В. Оценка эффективности санаторно-курортного лечения детей / А.В. Мазурин, К.И. Григорьев // Болезни печени и поражения желчевыводящих путей у детей: Сб тр. 2-го Московского мед. ин-та им. Пирогова. М, 1984. - С. 56-58.
23. Руководство по гастроэнтерологии: В 3 т. Т. 1. Болезни пищевода и желудка / Под общ. ред. Ф.И. Комарова, А.Л.

24. Hirschowitz B.I. Zollinger-Ellison syndrome: pathogenesis, diagnosis, and management / B.I. Hirschowitz // *Am. J. Gastroenterol.* -1997 Vol. 92, Suppl. 4. - P. 44-48.
25. Marshall B. J. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis / B. J. Marshall // *Lancet.* 1983. - Vol. 2, №8336. - P. 1273-1275
26. McCott K. E. L. Helicobacter pylori, gastric acid, and duodenal gastric metaplasia / K. E. L. McCott // *Gut.* 1996. - Vol. 39. - P. 615-617.
27. Stene-Larsen G. Follow up study of erosive prepyloric changes / G. Stene-Larsen, A. Nesland, A. Berstad // *Scand. J. Gastroenterol.* -1989. -№ 24. - P. 430-433.
28. Юнусова, А.И.; Литвинова, И.С.; Карпенко, П.А.; Тохидпур, А. Цитотоксин-ассоциированный ген A (CagA) Helicobacter pylori: парадигма онкогенного фактора вирулентности // *Журнал СФУ* –2017
29. Щербак, В. А. Значение цитокинов в патогенезе хронического гастродуоденита, ассоциированного с H. pylori, у детей / В. А. Щербак, Ю. А. Витковский // *Педиатрия.* –2005. – № 5. – С. 11-13.
30. Correlation between helicobacter pylori and gastric diseases: a study in King Fahad Hospital at Al-Baha of Saudi Arabia / K. H. Khan, M. Begum, M. Saleh [et al.] // *Mymensingh. Med.J.* – 2009. – Vol. 18, № 1. – P. 113–118.
31. Parkin, D. M. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002 / D.M. Parkin // *Int. J. Cancer.* – 2006. – Vol. 118, № 12. – P. 3030–3044.
32. Ables, A. Z. Update on Helicobacter pylori treatment / A. Z. Ables, I. Simon, E. R. Melton // *Am. Fam. Physician.* – 2007. – Vol. 75, № 3. – P. 351–358.
33. Ciortescu, I. Helicobacter pylori – friend or foe? / I. Ciortescu, M. Stan // *Rev. Med. Chir.Soc. Med. Nat. Iasi.* – 2010. – Vol. 114, № 3. – P. 619–624.
34. Positive association between Helicobacter pylori and gastroesophageal reflux disease in children / A. Moon, A. Solomon, D. Beneck [et al.] // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* –2009. – Vol. 49, № 3. – P. 283–388.

35. Influence of sociodemographic factors on *Helicobacter pylori* prevalence variability among schoolchildren in Leipzig, Germany. A long-term follow-up study / S. Bauer, P. Krumbiegel, Richter [et al.] // *Cent. Eur. J. Public. Health.* – 2011. – Vol. 19, № 1. – P. 42–45.
36. In French children, primary gastritis is more frequent than *Helicobacter pylori* gastritis / N. Kalach, S. Papadopoulos, E. Asmar [et al.] // *Dig. Dis. Sci.* – 2009. – Vol. 54, № 9. – P. 1958–1965. 193.
37. Epidemiological characteristics of *Helicobacter pylori* infection in Moscow / S. V. German, I. E. Zykova, A. V. Modestova [et al.] // *Gig. Sanit.* – 2011. – № 1. – P. 44–48.
38. Svarval', A. V. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection among population of Northwestern federal district of Russian Federation / A. V. Svarval', R. S. Ferman, A. B. Zhebrun // *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* – 2011. – № 4. – P. 84–88.
39. Распространенность атрофического гастрита в разных популяциях Сибири по данным серологического исследования / О. В. Решетников, С. А. Курилович, С. А. Кротов [и др.] // *Клиническая медицина.* – 2008. – № 7. – С. 35–38.
40. Evaluation of *Helicobacter pylori* status and endoscopic findings among new outpatients with dyspepsia in Japan / S. Shiota, K. Murakami, A. Takayama [et al.] // *J. Gastroenterol.* – 2009. – Vol. 44, № 9. – P. 930–934.
41. Цуканов, В. В. Эпидемиология язвенной болезни / В. В. Цуканов, О. В. Штыгашева, С. В. Баркалов. – Красноярск, 2004. – 213 с.
42. Al-Sulami, A. A. Isolation and identification of *Helicobacter pylori* from drinking water in Basra governorate, Iraq / A. A. Al-Sulami, A. M. Al-Taei, M. G. Juma'a // *East. Mediterr. Health. J.* – 2010. – Vol. 16, № 9. – P. 920–925.
43. Поливанова, Т. В. Распространенность и клинико-морфологическая характеристика гастродуоденальной патологии у школьников различных регионов Восточной Сибири : автореф. дис. ... д-ра мед. наук : 14.00.09, 14.00.05 / Поливанова Тамара Владимировна. – Красноярск, 2007. – 48 с.

44. Распространенность инфекции *Helicobacter pylori* и ее ассоциация с клинико-морфологическими проявлениями гастродуоденальной патологии в этнических популяциях детей Республики Тывы / Т. В. Поливанова, В. Т. Манчук, В. А. Вшивков, М.В. Гончарова // Педиатрия. – 2013. – Т. 92, № 6. – С. 135-140.
45. Щербаков, П. Л. Вопросы педиатрической гастроэнтерологии / П. Л. Щербаков // РМЖ. Детская гастроэнтерология и нутрициология. – 2003. – № 3. – С. 103–112.
46. Поливанова, Т. В. Ассоциация клинико-морфологических проявлений гастродуоденальной патологии с уровнем потребления животного белка у школьников Эвенкии /Т. В. Поливанова, В. В. Цуканов // Якутский медицинский журнал. – 2009. – № 3. – С.128-130.
47. Поливанова, Т.В. Региональные особенности течения инфекции *Helicobacter pylori* у детей европеоидного населения Сибири / Т. В. Поливанова, В. А. Вшивков, В. И. Фурцев, М. В. Гончарова // Вопросы детской диетологии, 2012. – Т. 10,- С.9-13.
48. Щербак, В.А. Иммунные нарушения и обоснование их коррекции при хроническом гастродуодените у детей / В.А. Щербак, Ю.А. Витковский, Б.И. Кузник // Медицинская иммунология. – 2008. – Т. 10, № 1. – С. 59-66.
49. Распространенность инфекции *Helicobacter pylori* и ее ассоциация с клинико-морфологическими проявлениями гастродуоденальной патологии в этнических популяциях детей Республики Тывы / Т. В. Поливанова, В. Т. Манчук, В. А. Вшивков, М.В. Гончарова // Педиатрия. – 2013. – Т. 92, № 6. – С. 135-140.
50. Клинико-морфологические особенности гастрита у школьников Эвенкии в этнических популяциях / В.Т. Манчук, Т.В. Поливанова, В.А. Вшивков, М.В. Гончарова / Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2012. – Т. 84, №2. – С.45-49.
51. Поливанова, Т. В. Распространенность и клинико-морфологическая характеристика гастродуоденальной патологии у школьников различных

регионов Восточной Сибири :автореф. дис. ... д-ра мед. наук : 14.00.09,
14.00.05 / Поливанова Тамара Владимировна. – Красноярск, 2007. – 48 с.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
В. Краши В.А.Кратасюк
«20» июня 2017 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ФАГОЦИТОВ КРОВИ У
ДЕТЕЙ С ЭРОЗИВНЫМ ПОРАЖЕНИЕМ ЖЕЛУДКА И 12 ПЕРСТНОЙ
КИШКИ

06.04.01 «Биология»
06.04.01.07 «Биофизика»

Руководитель		д. б. н., профессор	О. А. Коленчукова
Выпускник			И. С. Литвинова
Рецензент		д. м. н., профессор	С. Ю. Терещенко

Красноярск 2017