

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

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой  
\_\_\_\_\_ Е. И. Шишацкая

«\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 – Биология

Особенности хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов у  
больных хроническим гастритом, хроническим атрофическим гастритом,  
ассоциированных с *H. pylori*-инфекцией

Научный руководитель \_\_\_\_\_ профессор, д.м.н О.В. Смирнова  
подпись, дата  
Выпускник \_\_\_\_\_ А.Д. Чикункова  
подпись, дата

Красноярск 2018

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	3
1 Обзор литературы .....	5
1.1 Этиология хронического гастрита и хронического атрофического гастрита, ассоциированного с <i>H. pylori</i> -инфекцией.....	5
1.2 Патогнез хронического гастрита и хронического атрофического гастрита,ассоциированного с <i>H. pylori</i> -инфекцией .....	10
1.3Осложнения вызванные хроническим гастритом и хроническим атрофическим гастритом,ассоциированного с <i>H. pylori</i> -инфекцией.....	13
1.4Диагностика и лечение хронического гастрита и хронического атрофического гастрита,ассоциированного с <i>H. pylori</i> -инфекцией.....	15
1.5Общая характеристика нейтрофильных гранулоцитов.....	18
1.6Иммунный ответ при ХГ и ХАГ , ассоциированном с <i>H. pylori</i> .....	20
2 Материалы и методы .....	22
2.1 Объект исследования .....	22
2.2 Хемилюминесцентный анализ активности нейтрофильных гранулоцитов .....	23
2.3 Статистический метод обработки данных .....	24
3 Результаты и обсуждения исследования .....	25
Заключение .....	36
Список сокращений .....	37
Список использованных источников .....	38

## ВВЕДЕНИЕ

Хронический гастрит — группа заболеваний, характеризующихся диспепсическими проявлениями и наличием воспалительных и дистрофических процессов в слизистой оболочке желудка, ее прогрессирующей атрофией, функциональной и структурной перестройкой.

Наиболее частой причиной хронического гастрита является инфекция *Helicobacter pylori*, что связано с высокой распространенностью этого микроорганизма в популяции.

Хронический гастрит в сочетании с *H. pylori* развивается более чем у 70% инфицированных *H. pylori* уже в детском и подростковом возрасте, а у взрослых инфицирование наступает значительно реже – около 2% в год [1].

*H. pylori* под действием неблагоприятных факторов внешней среды обладает способностью образовывать кокковые формы. Такие формы теряют ферментативную активность и репродуктивную способность, устойчивы к внешним воздействиям. При этом у них редуцируется обмен веществ, что создает благоприятные условия для сохранения бактерий в кишечнике или во внешней среде. Попав в благоприятные условия, такие формы *H. pylori* могут вновь трансформироваться в вегетативные формы, способные колонизировать слизистую оболочку желудка.

Ряд научных исследований, как в России, так и за рубежом доказывает, что хронический гастрит и рак желудка взаимосвязаны. Р. Correa предложил в 1988 г. каскад модели развития рака желудка, а именно патологических явлений (атрофия, метаплазия, дисплазия) [2].

Таким образом, *H. pylori*-инфекция, хронический гастрит, хронический атрофический гастрит, кишечная метаплазия и рак желудка — звенья одной цепи, характеризующиеся развитием дисрегенераторных изменений эпителия, создающего, в свою очередь, фон для развития рака желудка. Чтобы предотвратить заболевание, в первую очередь, необходимо обратиться к специалистам для ранней диагностики. Хронический атрофический гастрит

многократно увеличивает риск развития рака желудка, поэтому диагностика атрофии имеет важнейшее клиническое значение с позиций вторичной профилактики рака желудка.

Защитой организма от внешних и внутренних патогенных факторов является иммунная система. Функции иммунитета многообразны. В организме иммунитет принимает участие во всех регуляторных процессах [4] Нейтрофильные гранулоциты, являясь неспецифическими фагоцитами, первыми участвуют во всех воспалительных процессах. От функционирования данных клеток во многом зависит прогноз самого заболевания.

Таким образом, целью работы явилось изучение особенностей неспецифического звена иммунитета у больных хроническим гастритом, ассоциированным с *H. pylori*-инфекцией.

Задачи:

1. Определить спонтанную хемилюминесцентную активность нейтрофильных гранулоцитов у больных хроническим гастритом, хроническим атрофическим гастритом, ассоциированных с *H. pylori*-инфекцией, относительно контрольной группы.

2. Определить индуцированную хемилюминесцентную активность нейтрофильных гранулоцитов у больных хроническим гастритом, хроническим атрофическим гастритом, ассоциированных с *H. pylori*-инфекцией, относительно контрольной группы.

Исследование проводилось на базе НИИ медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН, в лаборатории клинической патофизиологии.

## 1 Обзор литературы

### 1.1 Этиология хронического гастрита и хронического атрофического гастрита, ассоциированного с *H. pylori*-инфекцией

Хронический гастрит является самым распространенным заболеванием желудочно-кишечного тракта. Диспепсические симптомы входят в число самых распространенных жалоб со стороны желудка [3].

Данное заболевание встречается более чем у половины взрослого населения. Хронический гастрит может протекать бессимптомно в большинстве случаев, но, как правило, существуют различные клинические проявления, которые связаны с сопутствующими гастродуоденальными, функциональными и дискинетическими нарушениями, поэтому данное заболевание, как самостоятельный диагноз не имеет большого прямого клинического значения и находится в противоречии с пониманием данной нозологии клиницистами и морфологами. С точки зрения морфологии, хронический гастрит – это длительно текущее рецидивирующее заболевание с воспалительным поражением слизистой оболочки желудка. Точный диагноз у таких пациентов может быть поставлен только после проведения гистологического исследования биопсийного материала слизистой оболочки желудка [5].

В 1988 г. R. Correa предложил в каскад модели развития рака желудка, в котором говорится о том, атрофический гастрит, связанный с инфекцией *Helicobacter pylori* обычно образуется после поверхностного хронического гастрита и является следующей ступенью на пути к раку желудка [1].

С 1990 года существует всемирная Сиднейская классификация. Согласно данной классификации, диагноз заболевания хронического гастрита должен формулироваться на основании четырех признаков заболевания:

1. Локализация патологического процесса.
2. Гистологические признаки, выявленные при исследовании биоптатов слизистой оболочки.

3. Макроскопические признаки, выявленные при эндоскопии желудка.
4. Вероятные этиологические факторы.

После того как специалист провел все этапы исследования, получаем данные, которые позже оцениваются с помощью знаковой системы, которая носит название «визуально - аналоговая шкала». Знаками в этой системе является четыре различных степени: норма-отсутствие признака, слабый гастрит, умеренный гастрит, а также выраженный гастрит [4].

Уже более позднее, в 1994 году, были внесены важные дополнения в Сиднейскую классификацию, в результате изменилось и название классификации – Хьюстонская, в соответствии с которой различают [4]:

1. Неатрофический или Поверхностный гастрит – в качестве этиологического фактора указывается *H. pylori*.

2. Атрофический гастрит – с инфекцией *H. pylori* ассоциирован мультифокальный атрофический гастрит с вовлечением тела и антрального отдела желудка. Атрофический гастрит тела желудка имеет аутоиммунную природу.

3. Особые формы хронического гастрита – химический (в т. ч. из-за воздействия желчи, НПВП), лимфоцитарный, эозинофильный, неинфекционный гранулематозный, лучевой.

Рассмотренные классификации течением времени утратили свою значимость, это связано с большим объёмом в использовании диагностики. В результате нашли выход с этой ситуации и облегчали определение прогноза ХГ. В самую первую очередь нужно было определить и поставить оценку степени риска, развития рака желудка. Изначально исследователи брали за основу Сиднейскую классификацию, но она в дальнейшем была откорректирована практически до неузнаваемости. В итоге исследователи и ученые получили новую систему оценивания степени и конкретно стадии атрофии слизистой оболочки желудка - OLGA (OperativeLinkforGastritisAssessment) [42].

Под степенью гастрита понимают выраженность суммарной воспалительной инфильтрации (нейтрофильными лейкоцитами и

мононуклеарными клетками), под стадией – выраженность атрофии. Такая система дает достаточно полную характеристику гастрита и отражает его динамику: от обратимого воспаления, с одной стороны, до выраженной атрофии, ассоциированной с повышенным риском развития рака желудка, с другой [5].

Чтобы получить оценку выраженности атрофии нужно у больного взять биоптат (материал, полученный путем биопсии) из тела и антрального отдела желудка. При наличии биоптата, точнее с его помощью, определяют стадию и степень хронического гастрита. Врач, анализируя результаты, смотрит на степень выраженности и объём поражения атрофии и делает заключение, чем более выражена степень атрофии и чем больше объём поражения, тем выше риск развития рака желудка. Такая схема позволяет врачу получить представления о распространенности повреждения СОЖ и степени риска развития рака желудка у пациента.

Возникновение и дальнейшее прогрессирование хронического атрофического гастрита обусловлено воздействием на слизистую оболочку желудка множества факторов, которые приводят к хроническому воспалению, атрофии желез и метаплазии слизистой оболочки желудка

В этиологии хронического гастрита и хронического атрофического гастрита существуют группы факторов. Всего выделяют две группы: экзогенные и эндогенные[6].

Основные экзогенные факторы, способствующие возникновению ХГ и ХАГ:

1. инфицирование *H. pylori*
2. злоупотребление алкоголем
3. табакокурение
4. длительный прием лекарств, раздражающих СОЖ
5. воздействие на СОЖ химических агентов
6. воздействие радиации, а также другие бактерии (кроме *H. pylori*);
7. грибы, паразиты

8. алиментарные погрешности и несбалансированность пищевого рациона

Основные эндогенные факторы, способствующие возникновению ХГ и ХАГ:

1. генетические факторы
2. дуоденогастральный рефлюкс
3. аутоиммунные факторы
4. эндогенные интоксикации
5. хроническая инфекция
6. нарушение обмена веществ
7. эндокринные дисфункции
8. гиповитаминозы
9. рефлекторные влияния на желудок других пораженных органов.

В 1979 году патологу Робину Уоррену и доктору Барри Маршаллу удалось сделать одно из величайших открытий, а именно культивировать бактерию *Helicobacter pylori*, которое внесло множество нового в современное представление о патогенезе хронического гастрита, а также о его взаимосвязи с развитием рака желудка [7].

*Helicobacter pylori* – грамотрицательная, микроаэрофильная бактерия, колонизирующая слизистую желудка и ассоциированная с язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки, хроническим гастритом, атрофическим гастритом, аденокарциномой [8].

Бактерия *H. pylori*, колонизируется в слизистой оболочке желудка. Она и будет служить возбудителем хронического гастрита. *H. pylori* под действием различных неблагоприятных факторов внешней среды обладает способностью образовывать кокковые формы. Бактерия обладает спиралевидной формой и жгутиками, что позволяет ей быстро продвигаться как в желудочном соке, так и в вязком слое желудочной слизи и полностью заселять СОЖ[9].



Кокковые формы теряют свою ферментативную активность и репродуктивную способность. Они не поддаются культивированию на искусственных питательных средах, устойчивы к внешним воздействиям, и даже к действию антибактериальных препаратов, у них редуцируется обмен веществ, что создает благоприятные условия для сохранения бактерий в кишечнике или во внешней среде, откуда они могут передаваться человеку фекально-оральным путем. После чего бактерия попадает в весьма благоприятные для нее условия, а это означает, что такие формы *H. pylori* могут вновь трансформироваться в вегетативные формы, которые в свою очередь способны вновь колонизировать слизистую оболочку желудка.

Строение клеточной стенки в сравнении кокковидной клеткой отличается деталями, в результате происходит нарушение процесса узнавания бактерии иммунной системой [10].

Бактериальная клетка *H. pylori* окружена хлопьевидным слоем гликокаликса. Гликокаликс представляет собой гликопротеидный полианионный гель, поддерживаемый матрицей. На 99 % он состоит из воды, а также липополисахаридов и белков, необходимых для адгезии *H. pylori* на поверхности эпителиоцитов, вызывающих развитие воспаления слизистой желудка. Гликокаликс выполняет функцию анионного полимерного барьера и обладает способностью к образованию уреазы. Он обеспечивает невосприимчивость бактерии к антибиотикотерапии и защищает микроорганизм от иммунного ответа хозяина. Разрушение гликокаликса приводит к повреждению бактериальной клетки, а в дальнейшем и к ее гибели. Наиболее благоприятными условиями существования бактерии являются температура 37–42. °С и рН среды 6-8. При более низких значениях рН (4-6) бактерии сохраняют свою жизнеспособность, но прекращают рост и размножение [11].

По этиологическому значению бактерия *H. pylori* на данный момент времени хорошо изучена. Благодаря приложенным усилиям, трудам ученых и исследователей, подробное и тщательное изучение заболеваний, ХГ и ХАГ,

стало весьма значимой нозологической единицей с уже известной причиной и следствием. И все это позволило продвинуться в разработке эффективного этиотропного лечения. Одной из главных задач этого лечения является снижение и нейтрализация самой бактерии в организме человека.

Распространенность хронического гастрита в мире очень велика и охватывает от 50 до 80 % взрослого населения нашей планеты [12].

Выяснено, что с возрастом больного происходит изменения показателей в слизистой оболочке желудка, к примеру, повышается выраженность и частота гастрических изменений. Так же не исключают тот факт, что все изменения показателей во многом зависят от места проживания людей и окружающих условий.

Гастрические изменения могут приводить к упорному прогрессированию атрофии в СОЖ. У больного, общее ухудшение состояние может и не наблюдаться, но дальнейшим результатом окажется развития других, уже более тяжелых заболеваний, к примеру, рак желудка. Атрофический гастрит, ассоциированный с *H. pylori*, мы рассматриваем как предраковое заболевание, значит, и выбор правильной тактики ведения пациента с данной формой хронического гастрита может служить мерой профилактики и дальнейшего предотвращения развития рака желудка.

## **1.2 Патогенез хронического гастрита и хронического атрофического гастрита, ассоциированного с *H. pylori*-инфекцией**

Уже ранее отмечалось, что под воздействием экзогенных и эндогенных факторов происходит нарушение регенерации СОЖ. В результате подавления дифференцировки клеток, развиваются функционально незрелые эпителиальные клетки, которые утрачивают свою защиту и начинают легко повреждаться и гибнуть от вредных воздействий. В настоящее время выяснена причина возникновения хронического гастрита - бактерия *H. pylori*. Бактериальная клетка окружена слоем гликокаликса, что является депо для

фермента уреазы. *H. pylori*-инфекция содержит много уреазы. Вырабатываемый фермент защищает *H. pylori* от кислого содержимого рН желудка. Что касемо строения, то бактерия имеет спиралевидную форму, у *H. pylori* имеются жгутики, которые помогают ей активно передвигаться в желудочном соке, а также в слое желудочной слизи постепенно заселяя СОЖ колониями. В процессе работы бактерии в желудке у человека начинается активная избыточная выработка соляной кислоты, которая в свою очередь сильно повреждает и разрушает слизистую оболочку желудка [9,13].

У бактерии *H. pylori* множество патогенных факторов, благодаря которым она спокойно продолжает колонизироваться не испытывая какого-либо дискомфорта, поэтому бактерию очень тяжело уничтожить и вывести с организма.

Рассмотрим варианты, как бактерия попадает и локализуется в организме человека. Большинство людей инфицируются *H. pylori* в раннем детском возрасте через поцелуи родителей, родственников и через грязные руки, использование общей посуды. У взрослых инфицирование происходит через плохо обработанные эндоскопы и зонды — контактный механизм инфицирования. Инфекция может распространяться через источники водоснабжения, поскольку бактерии удалось культивировать из кала, слюны, налета на зубах инфицированных лиц [14].

Если рассматривать процесс проникновения бактерии у больного ХГ более подробно и детально, то в целом все это будет выглядеть следующим образом. К примеру, *H. pylori*-инфекция со слюняваемой слюной проникает в пищу и уже с ней попадет в просвет желудка. После того как бактерия попала в желудок, у организма начинается защитная реакция направленная на подавление и уничтожение любых микроорганизмов за счет влияния соляной кислоты на желудочный сок. Но бактерия оказывается намного хитрее и в свою очередь начинает продуцировать уреазу, которая будет вызывать токсическое действие, и уже в дальнейшем будет обеспечивать существование *H. pylori* в сильнокислой среде. Благодаря воздействию фермента уреазы будет

происходить распад мочевины, которая проникает в желудок из кровяного русла через стенки капилляров, на углекислый газ и аммиак. В результате выделения аммиака происходит процесс защелачивания среды, который конечно же будет оказывать токсический эффект на СОЖ, но главное то, что при нейтрализации соляной кислоты желудочного сока аммиаком, бактериальной клетке обеспечиваются те условия, в которой она сможет спокойно существовать и размножаться. В дальнейшем *H. Pylori* из просвета желудка проникает в слой защитной слизи, бактерия адгезируется на покровно-ямочном эпителии антрального отдела желудка. Часть микробов проникает в собственную пластинку через межэпителальные контакты. Кроме того, что в желудке происходит защелачивание среды, то параллельно этому процессу возникает снижение вязкости желудочной слизи в результате разрушения муциназой белка муцина. После тщательного изучения стало известно, что бактерия влияет на подавление синтеза муцина в организме, а также выделение каталазы делает возможным процесс подавление иммунного ответа организма. Из курсов энзимологии и биохимии, мы знаем, что каталаза - это фермент являющийся катализатором реакции, в данном случае, бактерицидных соединений кислорода, высвобождаемых активированными в результате инфекции нейтрофилами в такие вещества, как  $H_2O$  и  $O_2$ . По итогу выходит так, что бактерия позволяет миновать разрушительное воздействие со стороны нейтрофилов [16,17].

Что касаето больных ХАГ, то патогенез также связан с *H.pylori*-инфекцией [18].ХАГ начинается с воспаления СОЖ в антральном отделе желудка. Воспаление СОЖ постепенно начинает прогрессировать, что в дальнейшем приводит к атрофическим изменениям слизистой. При ХГ у больного в организме происходит исчезновение обкладочных клеток. В результате получается, что с момента заболевания ХГ до поздней стадии ХАГ изменяется состояние париетальных клеток. Полагают, что при инфицировании бактерией происходит образование хронического гастрита, что в дальнейшем приводит к атрофическому гастриту (мультифокальному). И дальше видим, что

следует гиперплазия париетальных клеток желудка, гиперсекреция соляной кислоты и пепсина, низкая степень апоптоза и высокая — пролиферации, что обеспечивает риск возникновения мутаций и рака желудка.

Подводя итог патогенеза, можно объективно сказать, что в настоящее время хорошо изучена взаимосвязь между инфекцией *Helicobacter pylori* с важными патологиями желудка. А также известен механизм провоспалительного иммунного ответа, вырабатываемого в желудочных тканях, инфицированных *H. pylori*, что в результате свидетельствует о гастрите (ХГ) и ряде морфологических изменений (ХАГ), которые повышают восприимчивость к раку развития [19].

### **1.3 Осложнения, вызванные хроническим гастритом и хроническим атрофическим гастритом, ассоциированного с *H. pylori***

Благодаря P.Correa ,на сегодняшний день известна взаимосвязь между бактерией *H. pylori*, хроническим гастритом, хроническим атрофическим гастритом, кишечной метаплазией и раком желудка. В 1988 году P. Correa была выдвинута модель развития рака желудка, которая получило название - каскад Correa [20].

Вся суть каскада отображается в его деталях. Перед тем как организм поражается раком желудка, то перед этой стадией у больного активизируется действия различных патологических процессов в СОЖ. Если каскад представлять в виде визуально-аналоговой шкалы, то изначально у человека в желудке видится абсолютно нормальная слизистая оболочка, после происходят изменения и наступает стадия атрофического гастрита. Без должного или, быть может, неэффективного лечения в дальнейшем картина все будет ухудшаться и наступит кишечная метаплазия, после дисплазия и наконец, карцинома желудка [21].

С особой легкостью осложнения атрофического гастрита приводят к злокачественной опухоли. Атрофический гастрит и метаплазия рассматриваются

как предраковые состояния, после которых путь к РЖ становится необратимым[22].

Известный факт, что ХАГ с пониженной кислотностью имеет высокий риск трансформации в РЖ. Процесс будет, проходит таким образом, что при уже существующих атрофических изменениях СОЖ, условия обитания становятся весьма благоприятными для различных канцерогенов, а это значит, что противоопухолевая защитная функция ослабевает и происходит спокойное развитие злокачественного образования.

Ученые считают, что дисплазия тоже является предраковым изменением. Вообще, дисплазия имеет более высокую степень канцерогенеза. В этом процессе наблюдается патологическая пролиферация клетки с признаками атипии, а также стратификация клеточных слоев. У такого предракового состояния тоже имеются свои степени и всего их выделяют три: низкая, умеренная и высокая, либо обозначают их римскими цифрами. В целом происходит отклонение клеток и всего тканевого комплекса от нормальной структуры в направленности к неопластическому развитию [21].

С.В. Вернигородский и другие ученые [23] установили, что бактерия *H.pylori* влияет на все предраковые изменения слизистой оболочки желудка. Таким образом, получается, что существует прямая зависимость между частотой обнаружения метаплазии, дисплазии и степенью колонизации СОЖ бактерии, а также о причастности этого микроорганизма к ступенчатому процессу формирования предраковых изменений в желудке. При персистенции *H.pylori*-инфекции в слизистой оболочке антрального отдела метаплазию по толстокишечному типу выявляют достоверно чаще в слизистой оболочке антрального отдела, чем при ее отсутствии, что, несомненно, повышает риск развития РЖ [24].

Актуальность онкологических заболеваний растет с каждым годом в геометрической прогрессии. Ученые, что и делают, как только занимаются раскрытием истины различных злокачественных заболеваний. На данный

момент существуют прогнозы ученых международного агентства по исследованию рака (IARC) [25] .

Ученые предполагают, что к 2030 г. во всем мире число заболевших раком увеличится на 75%, а в странах с развитой и развивающейся промышленностью может превысить 93%. Согласно литературным данным, в последнее время отмечается тенденция к росту заболеваемости и смертности от рака во всем мире, прослеживается зависимость от уровня доходов населения[26].

Поданным IARC [26], страны с высоким уровнем доходов имеют самые высокие показатели заболеваемости РЖ, что связано, вероятно, с их более ранней диагностикой. А это, в свою очередь, способствует своевременности проведения лечения и снижения показателей смертности в этих странах.

Собрав все воедино, можно сказать, что желудочный канцерогенез— в первую очередь, многостадийный процесс, который характеризуется бесконтрольным размножением эпителиальных клеток СОЖ. Но стоит помнить, что этого можно избежать, если вовремя пройти диагностику и начать лечение, так как все начинается с ХГ, который со временем прогрессирует и приводит к росту атрофических изменений в слизистой оболочке желудка с последующим онкологическим исходом.

#### **1.4 Диагностика и лечение хронического гастрита и хронического атрофического гастрита, ассоциированного с *H. pylori*-инфекцией**

Врач-морфолог предварительно перед постановкой диагноза и назначения лечения, должен провести морфологическую диагностику минимум пяти биоптатов, из антрального отдела, хронического гастрита. Если врач видит изменения в СОЖ, а именно уменьшение числа желез с замещением на фиброзную ткань, либо на металлизированный эпителий, то он смело выдвигает диагноз – ХГ, делая полное и подробное описание заключения о степени гастрита и о наличии в ней бактерии. Конечно же, не исключается тот

факт, что случай может приобрести более тяжелый характер, и в биоптатах будут выявлены атрофические изменения, что ведёт к образованию ХАГ.

Существует инвазивная и неинвазивная диагностика ХГ и ХАГ. Неинвазивное выявление может быть проведено с использованием различных тестов, определяющих сывороточные маркеры атрофии. Главную роль будут играть пепсиногены. Это проферменты, зимоген пепсина отличающихся на 44 дополнительных АК [27].

Снижение уровня пепсиногена I, будет свидетельствовать о выраженности атрофии СОЖ, а атрофия антрального отдела будет диагностирована за счет уменьшения количества G-клеток и низкими уровнями базального и постпрандиального гастрин-17.

Нас, конечно же, интересует выявление в диагностике ХГ и ХАГ бактерии *H.pylori*. Чтобы уничтожить бактерию в организме больного нужно начать АХБТ (стартовая антихеликобактерная терапия). Первым и самым доступным считается уреазный тест на определение бактерии, как правило клиницисты сразу же его предлагают, так как безболезненно, быстро и недорого. Методика проведения не занимает много времени. Все начинается с того, что пациент делает нефорсированный выдох в специальный мешок - контейнер, после чего его сразу же герметично закрывают. Далее больному дают выпить стакан с раствором меченой мочевины и уже через 30 минут после выпитого предлагают снова повторить выдох в герметичный мешок. После всего начинается расшифровка показателей [28].

Для того чтобы вылечить ХГ и ХАГ ассоциированный с *H.pylori* инфекцией, необходимо провести эрадикационную терапию. Суть заключается в уничтожении бактерии в желудке и ДПК. Полная эрадикация бактерии позволит предотвратить развитие и дальнейшее прогрессирование предраковых изменений СОЖ, поэтому ее настоятельно советуют проводить с момента обнаружения и постановки диагноза хронического гастрита.

Лечение хронического атрофического хеликобактерного гастрита предполагает проведение эрадикационной терапии, целью которой является



полное уничтожение *H. pylori* в желудке и ДПК. ХГ непосредственно не будет связан с тягостной для больного симптоматикой, но эрадикационную терапию *H. pylori* при данном заболевании следует рассматривать как необходимую меру профилактики развития рака желудка. Только эрадикация *H. pylori* позволяет добиваться регресса явлений воспаления, а также предотвращать развитие или прогрессирование предраковых изменений слизистой оболочки [29].

Если же врач допустит стойкое подавление кислотной продукции желудка, то *H. pylori*-инфекция совершенно спокойно сможет переместиться из антрального отдела в тело желудка, где будет поражать СОЖ и образовывать характерное воспаление. Также антральный гастрит может переходить в пангастрит, а это значит, что вероятность развития атрофических изменений в СОЖ увеличиваются в разы и как результатом будет являться ятрогенный атрофический гастрит [30].

Таким образом, следует отметить, что диагностика и лечение ХГ и ХАГ строится и опирается на данные морфологических исследований, которые в первую очередь не только дает возможность точно выявить заболевание, но и может построить дальнейший прогноз изменений и конечно же открывает эффективные пути лечения. Конечно же, не стоит забывать о современной эрадикации бактерии *H. pylori*, которая даст возможность предотвратить развитие заболеваний и поставить жирную точку в прогрессе воспалительной инфильтрации. В результате будет происходить восстановление нормальной структуры слизистой оболочки желудка, а большая вероятность того, что прогресса атрофии, метаплазии, дисплазии и последующего рака желудка может и не быть [5].

## 1.5 Общая характеристика нейтрофильных гранулоцитов

Нейтрофильные гранулоциты представляют собой классические фагоциты и выступают в качестве антигенпрезентирующих клеток для Т - лимфоцитов. Нейтрофилы самыми первыми будут мигрировать к очагу воспаления под действием *H. pylori* хемоаттрактантов и будут уничтожать бактерии путем фагоцитоза. Об этом более чем подробней, мы рассмотрим позже. Адгезия, содержание самих нейтрофилов и, конечно же, фагоцитарная активность будут повышаться в результате воспалительного процесса, это все на начальном этапе, так как в последующем активность всех этих процессов будет снижаться.

Сами нейтрофилы, в процессе возникновения воспалительного каскада становятся мощными эффекторами, так же сами клетки являются посредниками между злокачественной опухолью и организмом.

При инфицировании СОЖ *H. pylori* бактерия приводит к развитию острого воспаления, так нейтрофилы первыми будут участвовать в иммунном ответе организма. Однако, бактериальная инфекция *H. pylori* способна изменять направление иммунного ответа, что приводит к уходу патогена от иммунологического надзора и несовершенству иммунной реакции, следовательно, к неэффективности работы неспецифического звена иммунитета.

При раке желудка активируются макрофаги, которые в конечном итоге не способны противостоять опухоли, тем самым, осуществляя нерезультативную работу всего неспецифического звена иммунной системе[11].

Если рассматривать более детально процесс взаимодействия бактерии с нейтрофилами, то мы увидим, что все начинается с попадания бактерии в организм и начала взаимодействия с рецепторами слизистой оболочки пищеварительного тракта. Эпителиоциты желудка начнут взаимодействие с липопротеинами, липосахаридами и тд[31].

Существует несколько процессов развивающихся при бактерии, которые приводят к реализации иммунного ответа. Мы рассмотрим более подробно

следующий механизм, при котором будет осуществляться выработка веществ напрямую самой бактерией (белок parA), и он заключается в стимулировании привлечения нейтрофилов за счет секреции бактерии хемокинов. Бактерия будет самостоятельно вырабатывать вещества через индукцию к выработке хемоаттрактантов для фагоцитов собственными клетками организма, как уже говорилось ранее [32].

Получается, что будет происходить адгезия лейкоцитов и макрофагов на поверхности самой бактерии, после чего будет следовать завершение процесса фагоцитозом, которую инициировали фагоциты, когда достигли бактериальную клетку. В дальнейшем в нейтрофилах активируются кислородзависимые бактерицидные механизмы и, которые и будут усиливать процессы гликолиза. В результате образуются такие соединения, как миелопероксидаза, пероксид водорода, кальпротектин, дефенсины и синглетный кислород. Эти соединения обладают выраженными бактерицидными свойствами. Однако бактерия будет уменьшать активность фагоцитоза благодаря ферменту уреазы. Супероксиддисмутаза, которая препятствует контакту бактериальной клетки с лейкоцитами, и каталаза, которая нейтрализует пероксид водорода в фагоцитарных вакуолях и предохраняет микроорганизм от действия активных радикалов, выделяемых макрофагами [10]. И уже как следствие *H. pylori* начинает запускать механизмы, препятствующие фагоцитозу.

Таким образом, *H. pylori* оказывает влияние на нейтрофилы, активируя их к продукции активных форм кислорода, что приводит к разрушению эпителиоцитов слизистой оболочки желудка. Но, в тоже время, бактерия использует нейтрофилы для внутриклеточного персистенция, угнетая фагоцитарную активность нейтрофилов и приводя к их гибели, что способствует срыву неспецифической резистентности.

## 1.6 Иммуный ответ при ХГ и ХАГ, ассоциированном с *H. pylori*

Полное искоренение возбудителя при иммунном ответе против бактерии *H. pylori* невозможно [33]. Когда *H. pylori* инфекция попадает в организм, то на ее пути активируются факторы защиты, которые будут препятствовать адгезии и размножению бактерии на эпителиоцитах, к примеру, сама СОЖ, соляная кислота желудочного сока, а также перистальтика желудка. Но бактерия очень устойчива и хитра, она начинает активировать свои патогенные факторы, которые в дальнейшем будут проходить поставленные им препятствия на пути бактерии. Исходя из этого *H. pylori*- инфекция начинает постепенно вырабатывать великое множество иммунных реакций.

К примеру, неспецифические механизмы защиты против бактерии реализуются за счет гуморальные и клеточные факторы. В ответ на антигены *H. pylori* плазматическими клетками СОЖ продуцируются иммуноглобулины классов IgA и IgG [34,35].

IgA участвует в создании местного иммунитета слизистой оболочки, препятствующих адгезии бактерий на эпителиальных клетках [36,37,38]. Активной формой IgA является секреторный IgA, который образуется из димерных молекул IgA при транспорте через эпителиальный слой [39].

Длительное выживание бактерии приводит к нарушению процесса образования полимера IgA, вследствие снижения экспрессии J-цепи, что в дальнейшем будет проследиваться снижение концентрации иммуноглобулина в желудочном соке [40]. Недостаточность секреторного IgA, сказывается на постепенной колонизации слизистых оболочек бактериями, и что в результате будет производить повышение нагрузки на клеточное звено иммунного ответа [41].

Получается следующее, что патоген полностью не нейтрализуется, следовательно, гуморальный ответ неэффективен, хоть нейтрофилы и макрофаги уничтожают бактерии фагоцитозом, активно продуцируя

бактерицидные вещества и провосполительные цитокины. Но бактерия, в свою очередь, обладающая факторами патогенности способна изменять направление иммунного ответа, которое в определенный момент сможет просто не среагировать и дать патогену развиваться.

## 2 Материалы и методы

### 2.1 Объект исследования

В работе приведены результаты комплексного лабораторного обследования больных с хроническим гастритом (ХГ) общей численностью 76 человек в возрасте от 20 до 70 лет (средний возраст составил  $44,7 \pm 0,9$  лет), группа с хроническим атрофическим гастритом – 24 пациентов. Контрольной группой служили 83 практически здоровых донора без гастроэнтерологических жалоб (45 мужчин и 38 женщин) в возрасте от 19 до 67 лет (средний возраст  $46,8 \pm 1,3$  лет). Больные с хроническим гастритом поступили в гастроэнтерологическое отделение НИИ медицинских проблем Севера. В работе с обследованными пациентами соблюдались этические принципы, предъявляемые ст. 24 Конституции РФ и Хельсинской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциацией. Каждый участник подписывал форму информированного согласия на обследование, подтверждающее его добровольное участие в исследовании.

Отбор больных и набор клинического материала производился методом случайной выборки по мере поступления в гастроэнтерологическое отделение НИИ медицинских проблем Севера.

Объектом исследования были люди у которых брали материал исследования, а именно венозную кровь, которая бралась утром с 8 до 9 часов, натощак, из локтевой вены, в пробирки Vacutainer с разделительным гелем и двойным активатором свертывания (кремнезем) и Vacutainer с раствором гепарина натрия (5 ЕД/ мл).

В исследование не включались пациенты с ВИЧ - инфекцией, страдающие гепатитом, туберкулезом, с язвенной болезнью желудка, имеющие сопутствующие острые и хронические заболевания в фазе обострения. Так же в исследования не включались лица старше 70 лет и пациенты, отказавшиеся принять участия в научном исследовании.

## 2.2 Хемилюминесцентный анализ активности нейтрофильных гранулоцитов

В качестве метода изучения активности нейтрофильных гранулоцитов использовался хемилюминесцентный анализ спонтанной и индуцированной продукции АФК НГ у больных хроническим гастритом и хроническим атрофическим гастритом.

Оценка спонтанной и индуцированной хемилюминесценции осуществляли в течение 90 минут на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе “CL 3606” (Россия).

Для подсчёта клеток в планшет добавляют 40 мкл уксусной кислоты 10 мкллейковзвеси и подсчитывают количество нейтрофильных гранулоцитов в камере Горяева в 5 больших квадратах по диагонали. Количество клеток определяют по формуле  $(X1*11*1000)/0,02=(X2/2000000)-1$  – количество Хенкса необходимо добавить к 1мл лейкоцитарной суспензии, где X1- суммарное количество клеток в 5 квадратах, X2-количество нейтрофилов в 1мл суспензии (необходимое количество клеток  $2*10^6$ ).

Для проведения хемилюминесцентного анализа используют следующие реактивы: донорскую сыворотку (группа крови АВ, резус-фактор отрицательный), раствор Хенкса (без фенолового красного), люминолв концентрации 100 мкл/мл. Готовят пробу: 200 мкл взвеси нейтрофильных гранулоцитов, 20 мкл донорской сыворотки, 240 мкл раствора Хенкса, 50 мкллюминола и 40 мклзимозана.

Регистрация результатов и управление анализатором осуществлялись через персональный компьютер. Определялись следующие характеристики: время выхода кривой на максимум интенсивности хемилюминесценции (Tmax), максимальное значение интенсивности хемилюминесценции (Imax), площадь кривой хемилюминесценции (S). В качестве усилителя хемилюминесценции использовали люминол. Индуктором респираторного взрыва служил

опсонизированным зимозан. Усиление хемилюминесценции, индуцированной опсонизированным зимозаном, оценивали по соотношению площади индуцированной (Синд) к площади спонтанной (Сспонт) хемилюминесценции и обозначали индексом активации. По результатам проведенных исследований была сформирована база данных.

### **2.3 Статистический метод обработки данных**

По результатам исследования на персональном компьютере в пакете электронных таблиц MS Excel 2010 была сформирована база данных. Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакетов прикладных программ Statistica for Windows 8.0 (StatSoft Inc., США, 2008) и Microsoft Excel, 2007 (Microsoft, США). Обработка полученных данных включала подсчет непараметрических данных: медиану (Me) и перцентили (С25-С75). Статистическую значимость различий определяли с использованием рангового критерия Манна–Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным  $p < 0,05$ . Использовался корреляционный анализ для выявления зависимостей показателей хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов от *H. pylori*, при этом  $r > 0,75$ , оценивалась как сильная корреляционная взаимосвязь,  $0,25 < r < 0,75$  средняя корреляционная зависимость и  $r < 0,25$  - слабая корреляционная зависимость.



### **3 Результаты и обсуждение исследования**

Из текста бакалаврской работы изъяты результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

H. pylori – Helicobacter pylori

PGI – пепсиноген I

PGII – пепсиноген II

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

НПВП – нестероидные противовоспалительные препараты

РЖ – рак желудка

СОЖ – слизистая оболочка желудка

ХАГ – хронический атрофический гастрит

ХГ – хронический гастрит

ХЛ- хемилюминесценция

IgA – иммуноглобулин А

IgG – иммуноглобулин G

ДПК- двенадцатиперстная кишка

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Маев, И.В. Кишечная метаплазия слизистой оболочки желудка в практике гастроэнтеролога: современный взгляд на проблему / И.В. Маев// РЖГГК. - 2006. - №4. - С. 38-48.
2. Корреа, П. А. Модель канцерогенеза желудка / П.А.Корреа // CancerRes. - 1998. - Том. 48. - С. 3554-3560.
3. Talley, N.J. Gastrointestinal tract symptoms and self-reported abuse: a population-based-study / N.J. Talley, S.L. Helgeson[etal]. //Gastroenterology. - 1992. – Vol. 102. – P. 1259 -1268.
4. Dixon, M. F Classification and grading of gastritis. The updated Sydney system. International workshop on the histopathology of gastritis, Houston 1994 / M. F. Dixon, R. M. Genta, J. H. Yardley [et al]. // Am J SurgPathol. – 1996. – Vol. 20. – P. 1161-1181.
5. Маев, И.В.Что мы знаем о хроническом гастрите / И.В. Маев, А.А. Самсонов, Н.Г. Андреев, С.А. Кочетов // Фарматека. –2011. -№ 10. –С. 10-16.
6. Звягинцева, Т.Д. Хронический гастрит / Т.Д. Звягинцева, Я.К. Гаманенко // Харьковская медицинская академия последипломного образования. – 2012. -№ 3-4(2). –С. 28-35
7. Все паразиты человека [Электронный ресурс]: Медпортал.- Режим доступа :<http://parazitoved.ru/infection/bacteria/helikobakter-pilori.html>
8. Момыналиев, К.Т. Макро- и микровариабельность гастрит – ассоциированной бактерии *Helicobacterpylori* /К.Т. Момыналиев // Биотехнология. Теория и практика. - 2009. - № 2 . - С. 28-47.
9. Семенова, Н.В. Особенности поведения колонии бактерии *Helicobacterpylori* в организме человека / Н.В. Семенова, Н.А. Шубина // Физиология человека. - 2004. - Т. 30. - № 2. - С. 129-134.

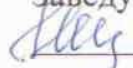
10. Шкитин, В. А. Роль *Helicobacter pylori* в патологии человека / В. А. Шкитин // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2002. – Т.4. – № 2. – С.128-145.
11. Саранчина, Ю. В. Оценка функционального состояния некоторых показателей иммунного ответа в патогенезе *Helicobacter pylori*-ассоциированного хронического гастрита: дис. ... канд. био. наук: 14.03.03 / Саранчина Юлия Владимировна. – Абакан, 2015. – 159 с.
12. Палий, И.Г. Клиническое обоснование целесообразности индивидуального подхода к подбору фармакопрепаратов у пациентов с патологией ЖКТ / И.Г. Палий, О.А. Ксенич // Журн. Медицина. – 2015. – №1(151). – С. 58-66.
13. Мирутко, Д. Д. *Helicobacter pylori*: патогенность, иммунный ответ организма и перспективы иммуномодулирующей терапии / Д. Д. Мирутко, А. В. Сапотницкий // Медицинский журнал. -2005. —№ 3. — С. 90-93.
14. Точилина, Е.А. HELICOBACTERPYLORI / Е.А. Точилина // Научное сообщество студентов XXI столетия. ЕСТЕСТВЕННЫЕ НАУКИ: сб. ст. по мат. VI междунар. студ. науч.-практ. конф.- 2012.- № 6.
15. Клиническая гастроэнтерология [Электронный ресурс]: - Режим доступа: [http://zinref.ru/000\\_uchebniki/03200medecina/060\\_00\\_00\\_Klinicheskaya-gastroenterologiya\\_Yakubchik/002.htm](http://zinref.ru/000_uchebniki/03200medecina/060_00_00_Klinicheskaya-gastroenterologiya_Yakubchik/002.htm)
16. Медицинский справочник MedPuls [Электронный ресурс]: Медпортал.- Режим доступа: <http://medpuls.net/guide/gastroenterology/hronicheskiy-gastrit>
17. Сукало, А.В. Хронические заболевания желудка и двенадцатиперстной кишки у детей / А.В. Сукало, А.А. Козловский // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. -2005.- № 3 (11).-С. 36-43.
18. Veijola, L.I. Association of autoimmune type atrophic corpus gastritis with *Helicobacter pylori* infection / L.I. Veijola, A.M.Oksanen, P.I. Sipponen, [et al]. // Endoscopy. – 2011. – № 43 (1). – P. 26-29.

19. Benoit, A. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection on gastric biopsies: Standard stain, special stain or immunohistochemistry / A. Benoit, N. Hoyeau, J. Fléjou // *Ann Pathol.* - 2018.
20. Correa, P. Gastric precancerous process in a high risk population: cohort follow-up / P. Correa // *Cancer Research.* – 1990. – Vol. 50, № 15. – P. 4737–4740.
21. Аруин, Л.И. Рак желудка /Л. И. Аруин//*Росс.журн. гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии.* – 2003. – Т. 13, № 3. – С. 36.
22. Vannella, L. Risk factors for progression to gastric neoplastic lesions in patients with atrophic gastritis / L. Vannella // *Aliment. Pharmacol. Ther.* – 2010. – № 31. – P. 1042–1050.
23. Вернигородский, С.В. Предраковые изменения слизистой оболочки желудка и инфекция *Helicobacter pylori* / С.В. Вернигородский, М.В. Минович // *Клиническая и экспериментальная морфология.* – 2015. – № 1. – С. 4–6.
24. Павлович, И.М. Влияние *Helicobacter pylori* на морфологическое состояние слизистой оболочки желудка при хроническом гастрите / И.М. Павлович, А.В. Гордиенко, [и др.]// *Медико-биологические и социально - психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях.* - 2013. -№ 2. –С. 32-35.
25. Freddie, B. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study / B. Freddie // *The Lancet Oncology.* – 2012. -Vol. 13, № 8. -P. 790–798.
26. Torre, L.A. Cancer statistics for Asian Americans, Native Hawaiians, and Pacific Islanders, 2016: Converging incidence in males and females / L.A. Torre // *CA Cancer. J. Clin.* – 2016. – Vol. 66, № 3. – P.182–202.
27. Мосина, Л.М. Иммуно-секреторные параллели при хроническом гастрите / Л.М. Мосина, М.А. Стенина, Л.В. Матвеева // *Медицинский альманах.* –2013. –№ 1 (25).-С. 28-31.

- 28.Что такое уреазный тест [Электронный ресурс]: Медпортал.- Режим доступа: <http://ozhivote.ru/chto-takoe-ureaznyiy-test/>
29. Correa P, Houghton J. / Carcinogenesis of Helicobacter pylori/ P. Correa, J. Houghton // Gastroenterology. -2007. -№133. –Р 659–72.
- 30.Ивашкин,В.Т.Хронический гастрит, вызванный инфекцией Helicobacterpylori: диагностика, клиническое значение, прогноз / В.Т. Ивашкин, А.А. Шептулин, Т.Л. Лапина // Пособие для врачей.- М. - 2009. – С. 24.
- 31.Backhed, F. Gastric mucosal recognition of Helicobacter pylori is independent of Toll-like receptor 4 / F. Backhed, B. Rokbi, E. Torstensson [et al]. // J Infect Dis. - 2003. - Vol. 187, № 5. - P. 829-836.
- 32.Ливзан, М. А. Факторы ответа хозяина на инфекцию Helicobacter pylori / М. А. Ливзан // Consilium Medicum. - 2010. — № 8. — Т. 12. — С. 10-14.
- 33.Исаков, В. А. Хеликобактериоз / В. А. Исаков, И. В. Домарадский. - М: Медпрактика-М, 2003. – 412 с
- 34.Смагина, Н. В. Особенности иммунитета у мужчин с язвенной болезнью желудка и 12-перстной кишки, ассоциированной с Helicobacter pylori / Н. В. Смагина // Журнал микробиологии, вирусологии, иммунологии. – 2000. - № 2. – С. 57 - 60.
- 35.Беляков, И. М. Иммунная система слизистых / И.М. Беляков // Иммунология. – 1997. - № 4. – С. 7- 12
- 36.Etolhi, G. Relationship between mucosal levels of Helicobacter pylori – specific IgA, interleukin-8 and gastric inflammation / G. Etolhi, J.B. Dawodu, C.S. Gemmell[et al]. // Clin. Sci. – 1999. – Vol. 96. - № 4. – P. 409–414.
- 37.Kirchner, T. Immunopathology of Helicobacter pylori Gastritis / T. Kirchner, H. Steininger, G. Faller // Digestion. - 1997. - Vol. 58. – P.14 - 16.
- 38.Wines, B. D. IgA receptors in health and disease / B. D. Wines, P. M. Hogarth // Tissue Antigens. – 2006. – Vol. 68, № 2. – P. 103–114.
- 39.Ярилин, А. А. Иммунология: учебник / А. А. Ярилин. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. - 752 с.

40. Birkholz, S. Decreased Helicobacter pylori-specific gastric secretory IgA antibodies in infected patients / S. Birkholz, T. Schneider, U. Knipp[et al]. // Digestion. – 1998. – Vol. 59. - № 6. – P. 638–645.
41. Yun, C. H. Natural killer cells and Helicobacter pylori infection: bacterial antigens and interleukin-12 act synergistically to induce gamma interferon production / C. H. Yun, A. Lundgren, J. Azem[et al]. // Infect. Immun. – 2005. – Vol. 73. - № 3. – P. 1482 – 1490.
42. Ruge, M. OLGA staging for gastritis: a tutorial / M. Ruge, P. Correa, F. Di Mario // Dig Liver Dis. — 2008. - Vol. 40 (8). — P.650-658.

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

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой  
 Е. И. Шишацкая


«19» июня 2018 г.

## БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Особенности хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов у  
больных хроническим гастритом, хроническим атрофическим гастритом,  
ассоциированных с *H. pylori*-инфекцией

Научный руководитель

  
подпись, дата

профессор, д.м.н О.В. Смирнова

Выпускник

  
подпись, дата

А.Д. Чикунова

Красноярск 2018