



УКРАЇНА

(19) UA (11) 24748 (13) U

(51) МПК (2006)

G01N 33/48

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту**(54) СПОСІБ НЕЕНДОСКОПІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ МОРФОЛОГІЧНИХ ЗМІН СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ АНТРАЛЬНОГО ВІДДІЛУ ШЛУНКА ПРИ ДУОДЕНАЛЬНІЙ ВИРАЗЦІ У СТУДЕНТІВ**

1

2

(21) u200702920

(22) 19.03.2007

(24) 10.07.2007

(46) 10.07.2007, Бюл. № 10, 2007 р.

(72) Благовещенська Альона Вікторівна

(73) ХАРКІВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ ПІСЛЯ-
ДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ (ХМАПО)

(57) Спосіб неендоскопічної діагностики морфологічних змін слизової оболонки антрального відділу шлунка при дуоденальній виразці у студентів, який здійснюють шляхом дослідження біологічного ма-

теріалу, який відрізняється тим, що у хворого в сироватці крові виявляють вміст гастрину-17 і, при підвищенні рівня гастрину-17 у порівнянні з нормою, діагностують неатрофічний активний антральний гастрит, при вірогідному зниженні концентрації пептиду ($2,52 \pm 0,21$ пмоль/л) в порівнянні з нормою та рівнями, встановленими у пацієнтів з неатрофічним антральним гастритом, діагностують наявність та поглиблення атрофічних змін слизової антрального відділу.

Корисна модель відноситься до медицини, а саме до гастроентерології і може бути використана для неендоскопічної діагностики морфологічних змін слизової оболонки шлунка при дуоденальній виразці у студентів.

Проблема *Helicobacter pylori* (HP)-асоційованої пептичної виразки (ПВ) на сьогодні залишається актуальною, оскільки остаточно не вирішеними залишаються питання ранньої діагностики, ефективного лікування, попередження рецидивів та несприятливих наслідків захворювання, в тому числі віддалених. Доведено, що HP є головною причиною хронічного гастриту, що згодом призводить до атрофії та метаплазії слизової оболонки з неповоротною втратою залоз шлунка та заміщенням їх фіброзною тканиною або метаплазованим епітелієм [Передерий В.Г., Ткач С.М., Скопиченко С.В. Язвенная болезнь. Прошлое. Настоящее. Будущее. - Киев, 2003. - 256с.].

В останні роки відмічається зростання частоти виявлення ПВ серед осіб молодого віку. Внаслідок зазначеного, пошук нових діагностичних підходів при гастродуоденальній виразці у осіб молодого віку є доцільним не тільки з медичної, але і з соціальної точки зору, а вивчення даного питання вкрай актуальне.

Відомим та провідним є спосіб діагностики морфологічних змін слизової оболонки шлунка при дуоденальній виразці, який здійснюють шляхом ендоскопічного дослідження [Передерий В.Г., Ткач С.М., Марусанич Б.Н. От Маастрихта 1-1996 до

Маастрихта 3-2005: Десятилетний путь революционных преобразований в лечении желудочно-кишечных заболеваний // Сучасна гастроентерологія. - 2005. - №6 (26). - С. 4-9]. Даний спосіб достатньо коштовний, і у багатьох країнах світу застосовується лише за чіткими показаннями. Також зазначимо, що діагностика атрофічних змін та їх віддалених наслідків за даними аналізу біопсійного матеріалу викликає певні труднощі та не завжди достатньо достовірна. Це пов'язано з достатньою суб'єктивністю методу, вогнищевим характером атрофічних змін, обмеженою кількістю біоптатів, що як слідство може призвести до гіпо- або гіпердіагностики. При наявності виразних запальних змін мікроскопічна картина слизової оболонки нерідко змінюється, і прояви атрофічного гастриту також можуть бути оцінені неадекватно (внаслідок неправильного висновку про втрату залоз, їх кількості або функціональної активності).

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення способу діагностики морфологічних змін слизової оболонки антрального відділу шлунка при дуоденальній виразці у студентів, в якому за рахунок зміни досліджуваних показників, досягається неінвазивне визначення чіткого серологічного маркера морфологічних змін антрального відділу шлунка.

Поставлена задача вирішується в способі неендоскопічної діагностики морфологічних змін слизової оболонки шлунка при дуоденальній виразці у студентів шляхом дослідження біологічного мате-

(13) U

(11) 24748

(19) UA

ріалу, згідно з корисною моделлю, у хворого в сироватці крові визначають вміст гастрину - 17 і при підвищенні рівня гастрину - 17 по зрівнянню з нормою, діагностують неатрофічний активний антральний гастрит, при вірогідному зниженні концентрації пептиду ($2,52 \pm 0,21$ пмоль/л) в порівнянні з нормою та рівнями, встановленими у пацієнтів з неатрофічним антральним гастритом, діагностують наявність та поглиблення атрофічних змін слизової антрального відділу.

В слизовій антрального відділу шлунка розташована найбільша кількість спеціалізованих клітин, що продукують G - 17. Між вмістом даного пептиду та результатами гістологічних досліджень шлунка встановлений чіткий кореляційний зв'язок. Так, по мірі втрати нормальних кислотоутворюючих залоз та виникнення атрофії, рівень G - 17 поступово знижується, а вміст гормону менш $2,5$ пмоль/л вважається свідченням атрофії шлункового епітелію та підвищеного ризику розвитку неопластичних змін у слизовій.

Даній серологічній стратегії можна віддавати перевагу при скринінгових обстеженнях великої кількості осіб, а також в умовах неможливості проведення ендоскопічного дослідження або при наявності протипоказань до нього.

Спосіб, що заявляється, здійснюють таким чином. Визначення G - 17 проводять імуноферментним методом з використанням специфічних наборів реагентів Biohit, Pic (Хельсінкі, Фінляндія). Вивчають вміст основної та найактивнішої фракції базального G (G-17), що цілком спроможна характеризувати загальну гастринопродукцію. Спосіб базується на імуноферментному сандвіч-аналізі шляхом вимірювання абсорбції після реакції пероксидації при довжині хвилі 450 нм з використання автоматичних фотометрів. Перед забором крові пацієнт не приймає медикаменти, що спроможні впливати на кислотопродукцію та протягом 10 годин утримується від прийому їжі. Зразки крові центрифугують (прискорення до 2000 G протягом 10-12 хвилин) та зберігають до проведення досліджень при температурі -70°C . Техніка досліджень відповідна сертифікованій інструкції фірми-виробника. Обробку результатів дослідження проводять ліцензованою програмою «Statistika 6,0», що дозволяє одержати необхідний рівень статичної обробки матеріалів.

Встановлено підвищення рівнів гастрину-17 в сироватці крові у обстежених з активним неатрофічним антральним гастритом. У пацієнтів з ознаками атрофії слизової оболонки антрального відділу шлунка виявлено вірогідне зниження концентрацій пептиду ($2,52 \pm 0,21$ пмоль/л) в порівнянні з нормою та рівнями, встановленими у пацієнтів з неатрофічним антральним гастритом.

Дня підтвердження отриманого результату провели порівняння результатів морфологічного дослідження біоптатів слизової оболонки шлунка 70 студентів з ДВ віком від 17 до 23 років, серед яких було 19 дівчин та 51 юнак. В залежності від наявності або відсутності атрофії слизової оболонки при морфологічному дослідженні біоптатів (за модифікованою Сіднейською системою [Арун Л.И. Новая международная морфологическая клас-

сификация гастрита // Архив патологии. - 1997. - Т. 59. - №3. - С. 3-7.]. Вказані студенти були розподілені на дві групи. Перша включала 35 пацієнтів, в яких виявлені ознаки атрофії антрального відділу шлунка. В другу групу увійшли 35 пацієнтів в яких діагностовано поверхневий (без ознак атрофії) антральний гастрит. ДВ у 24 пацієнтів (34,3%) була виявлена вперше, у 35 обстежених (50%) виразковий анамнез становив до 5 років, у 11 (15,7%) був від 5 до 10 років. Всі пацієнти з ПВ отримували ерадикаційну терапію згідно положенням Маастрихтського консенсусу 2-2000 [10]. Контролем були результати, що отримані у 20 здорових студентів (контрольна група).

Діагноз ПВ встановлювали за допомогою комплексного обстеження, що включало загальноклінічні, лабораторні та інструментальні методи. За результатами ендоскопічного методу виявляли наявність виразкового дефекту, візуально оцінювали стан слизової оболонки ГДЗ, визначали виразність гіперемії, гіпертрофії, наявність рефлюксів, отримували біопсійний матеріал для подальшого гістологічного та морфологічного дослідження. В ендоскопічному кабінеті проводили діагностику HP за допомогою швидкого уреазного тесту (URE-HP test-Express, Pliva). Рівні антитіл до HP визначали імуноферментним методом (HP IgG, Calbiotech Inc., CBI). Морфологічне дослідження біоптатів дало можливість вивчити стан слизової оболонки ГДЗ та встановити ступень контамінації HP за Л.І. Арунін [Арун Л.И., Григорьев П.Я., Исаков В.А., Яковенко Э.П. Хронический гастрит. - Амстердам, 1993. - 362с.]. Отриманий біопсійний матеріал (2-4 шматочки з антрального відділу та тіла шлунка) фіксували в 10% розчині формаліну, а потім заливали в парафін. Парафінові зрізи офарблювали гематоксиліном-еозином, пікрофуксіном за Ван-Гізоном. За стандартними методиками визначали характер та ступінь активності гастриту, наявність атрофії та кишкової метаплазії. Швидкість репаративних процесів вивчали за допомогою реакції Фельгіна. За рекомендаціями Г.Г. Автандилова за допомогою цитоаналізатору "Інтеграл-2 МТ", окуляр-мікрометра АМ 9-2, окулярної лінійки встановлювали кількісну клітинну характеристику запальної інфільтрації та проводили її диференціацію [Автандилов Г.Г. Проблемы патогенеза и патологоанатомической диагностики болезней в аспектах морфометрии. - М.: Медицина, 1984. - 288с.]. Гістологічну ідентифікацію HP, проводили шляхом фарбування зрізів за Романовським-Гимзою.

При морфологічному дослідженні біоптатів студентів контрольної групи слизова оболонка шлунка була представлена одношаровим циліндричним епітелієм без ознак дистрофії, що був покритий достатнім шаром мукоїдного секрету із достатньою кількістю муцину. Товщина слизової оболонки складала 754 ± 23 мкм (в нормі 670-820 мкм). Вміст базального G-17 в даній групі знаходився в межах середньостатистичної норми та складав $4,39 \pm 0,31$ пмоль/л. Серед обстежених контрольної групи HP інфікованих виявлено не було.

У пацієнтів з ПВ встановлено вірогідне підвищення титрів антихелікобактерних АТ до рівнів $2,11 \pm 0,62$ ($p < 0,05$) та позитивні результати швидкого уреазного тесту.

Морфологічне дослідження гастробіопатів студентів з НР-асоційованою ПВ виявило наявність у всіх без винятку змін, що свідчили про активність запального процесу різного ступеня. У покривному епітелії слизової відзначалися дистрофічні зміни, що характеризувалися порушенням полярності клітин, вакуолізацією їх цитоплазми, зменшенням межі між клітинами (нейтрофільна інфільтрація власної пластинки слизової оболонки, а також поверхневого та ямкового епітелію). Частіше клітини здобували високопризматичну або кубічну форму, мали у своїй більшості світлі ядра, іноді зустрічаються клітини з ознаками ущільнення ядра і його гіпохроматозом. Межі поміж такими клітинами були не досить чіткими. У ямках епітелію відзначалися дистрофічні зміни, ступінь виразності яких частіше носила вогнищевий характер. У окремих пацієнтів внаслідок посилення лейкопедезу мали місце внутрішньоямкові абсцеси. У значної кількості обстежених відмічено посилення злучення поверхневого епітелію до утворення чисельних мікродефектів, що, як правило, не виходили за власну м'язову пластину. На їх тлі частіше встановлювали фібриноїдний некроз, під яким мала місце помірна лімфолазмозитарна інфільтрація. Виявлена нерівномірність товщини слизової оболонки, що коливалася в межах 450-690мкм. НР виявлялися на поверхні епітеліального шару і були "обкутані" пухким слизом, частіше мали спіралеподібну форму, інтенсивно обарвлювалися. Виявлена пряма залежність ($r = 0,5$) між скупченням НР та інфільтрацією слизової оболонки поліморфно-ядерними лейкоцитами. Таким чином, у студентів з НР-асоційованою ПВ ДПК мав місце активний хронічний гастрит. Зміни локалізувалися переважно в антральному відділі шлунка.

Морфологічні зміни (без ознак атрофії) були характерними для всіх пацієнтів другої групи.

У обстежених першої групи на тлі активного запального процесу слизової оболонки діагностовані ознаки атрофії антрального відділу шлунка. Слід зазначити, що у пацієнтів даної групи не виявлено ознак атрофії тіла та мультифокальної атрофії (тіла та антруму). Морфологічними особливостями біопатів слизової пацієнтів першої групи були зменшення числа спеціалізованих клітин, що забезпечують секреторну та інкреторну функції шлунку, заміщення їх клітинами, що виробляють слиз. Товщина слизової оболонки становила 490 ± 40 мкм. Відмічена змінення структури поверхневого та ямкового епітелію, що був значно сплюсненим, та мав тенденцію до зниження метаболічних процесів у клітинах. Про це свідчили зернистість цитоплазми, невластива форма клітин, порушення полярності, мукодізакція головних клітин, інколи повне заповнення їх слизом. Ядра клітин були пікнотичними, з низькою щільністю ядерного хроматину, зниженою кількістю РНК. В фундаментальних залозах на місці головних та парі сталних клітин з'являлися клітини типу мукоцитів, що

не здатні виробляти основні інгредієнти шлункового соку. Клітинна інфільтрація носила дифузійний характер і локалізувалася переважно перигландлярно, найбільш виразною вона була в антральному відділі. Там же спостерігалось пошкодження щільних контактів між клітинами, зменшення кількості спеціалізованих клітин тубулярних антральних залоз. У головних клітинах, що збереглися, з'являлися невластиві цим клітинам включення, вакуолізація. Місцями мала місце також вогнищева фовеолярна гіперплазія поверхневого та залозистого епітелію. На всіх рівнях залоз постійно зустрічалися незрілі, так звані «молоді» клітини, в яких знаходили ознаки передчасної інволюції. Є підстави вважати, що розвиток запальних процесів внаслідок інфікування НР призводив до ушкодження епітелію, порушення міжклітинних контактів, вираженої запальної інфільтрації з ознаками активного гастриту, у відповідь на які активізувалася проліферація та міграція епітеліоцитів. При атрофії вказана захисна реакція ставала патологічною: посилено проліферуючий епітелій не піддавався повному дозріванню та не ставав спроможним до повноцінної функціональної активності.

Виявлено, що у пацієнтів з ПВ коливання рівнів базального G - 17 мали певну залежність від характеру морфологічних змін слизової оболонки шлунка. Так, у обстежених з ПВ, в біоптатах яких діагностовано активний поверхневий антральний гастрит без ознак атрофії, рівні G - 17 у переважної кількості пацієнтів були вірогідно підвищеними в порівнянні з контролем і склали $18,24 \pm 2,11$ пмоль/л. Розвиток активного запального процесу слизової на тлі інфікування НР (антральний хелікобактерний гастрит) спричиняв стимуляцію G-клітин з надлишковим випорохненням гастрину. Це може викликати збільшення маси парієтальних клітин, посилення продукції соляної кислоти, розвиток шлункової метаплазії у ДПК, де згодом починають колонізувати НР з утворенням запалення та виразкового дефекту.

Показники G - 17 були вірогідно низькими у пацієнтів з атрофічними змінами в порівнянні не тільки з контрольними, а і по відношенню до аналогічних показників у обстежених другої групи з неатрофічним активним антральним гастритом ($p \leq 0,05$). Тобто, атрофічний гастрит обмежений антральним відділом, свідченням якого була втрата нормально функціонуючих клітин та залоз, спричинив зниження вмісту G - 17. Зазначимо, що вміст пептиду вірогідно знижувався по мірі зростання атрофічних змін слизової антрального відділу ($p \leq 0,05$).

Таким чином певна залежність, що виявлена між морфологічною картиною слизової оболонки шлунка у студентів з НР-асоційованою ПВ та вмістом базального G-17, дає можливість припустити імовірний характер змін слизової в залежності від встановлених серологічним методом концентрацій пептиду.

Таким чином, гастрин-17 можна вважати умовним «маркером» морфологічних змін антрального відділу шлунка, оскільки вміст даного гормону дає можливість з високою вірогідністю оцінити імовірний стан слизової оболонки.

