



УКРАЇНА

(19) UA (11) 58525 (13) U
(51) МПК
G01N 33/49 (2006.01)МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ РЕЦИДИВУЮЧОГО ПЕРЕБІГУ ХРОНІЧНОЇ ГАСТРОДУОДЕНАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ У ДІТЕЙ

1

2

(21) u201013639

(22) 17.11.2010

(24) 11.04.2011

(46) 11.04.2011, Бюл.№ 7, 2011 р.

(72) ТЯЖКА ОЛЕКСАНДРА ВАСИЛІВНА, ЗАДО-
РОЖНА ТАМАРА ДАНИЛІВНА, БОБРОВА ВІРА
ІВАНІВНА, АРЧАКОВА ТЕТЯНА МИКОЛАЇВНА(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ(57) Спосіб діагностики і прогнозування рецидиву-
ючого перебігу хронічної гастродуоденальної па-
тології у дітей, що включає дослідження процесів
апоптозу і проліферації за допомогою імуногісто-
хімічного аналізу, який відрізняється тим, що
процеси проліферації та апоптозу визначають за-
лежно від нозологічної форми гастродуоденальної

патології та ступеня запальних змін слизової обо-
лонки шлунка та 12-палої кишки, оцінюють співвід-
ношення між активністю проліферації і апоптозу та
розвитком відповідної форми гастриту та дуодені-
ту і при значному підвищенні проапоптозного пока-
зника BAX (більше 50 % позитивно пофарбованих
клітин) та зниженні експресії антиапоптозного по-
казника Bcl-2 (менше 10 % позитивно пофарбова-
них клітин) на фоні різних параметрів показника
проліферації залежно від форм і ступеня запален-
ня слизової оболонки органів гастродуоденальної
зони при різних формах гастродуоденальної пато-
логії прогнозують прогресування запального про-
цесу у слизовій оболонці шлунка і 12-палої кишки
та рецидивуючий перебіг хронічної гастродуоде-
нальної патології у дітей.

Корисна модель, що заявляється, відноситься
до медицини, а саме дитячої гастроентерології і
може бути використана для діагностики і прогно-
зування рецидивуючого перебігу хронічної гастро-
дуоденальної патології у дітей.

У структурі хронічних захворювань органів
травлення 70-75 % займає хронічна гастродуоде-
нальна патологія (ХГДП) [1, 6]. Недостатня вивче-
ність цієї патології дозволяє розглядати її як акту-
альну проблему сучасної гастроентерології та
вимагає продовжувати пошук причин її виникнення
та вивчення особливостей перебігу. На теперішній
час, ХГДП у дітей розглядається як стадійне запалення слизової оболонки шлунку (СОШ) і слизової оболонки дванадцятипалої кишки (СОДПК), що супроводжується клітинною інфільтрацією, порушенням фізіологічної регенерації, зі схильністю до прогресування і поступовим розвитком дезорганізації СОШ та СОДПК [2, 3]. Згідно даним літератури, механізм формування морфологічних змін слизової оболонки органів гастродуоденальної зони залежить від форми гастриту та дуоденіту і наявності інфекції *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) [4, 7]. На теперішній час встановлено, що важливе значення в прогресуванні гелікобактерного запалення належить участі *H. pylori* в процесах клітинного віднов-

лення. Розвиток цієї інфекції приводить до порушень співвідношення проліферативних і апоптозних процесів, що відображаються в рівні експресії молекул Ki-67, PCNA, Bcl-2 і BAX [4, 8].

Однак, дані, що характеризують співвідношення проліферації та апоптозу при ХГДП, асоційованій з *H. pylori*, носять суперечливий характер. Дискутабельною залишається можливість зворотного розвитку морфологічних змін СОШ і покращення показників клітинного відновлення під впливом успішно проведеної ерадикаційної терапії.

Слід зазначити, що в останні роки в педіатричній гастроентерології мало зустрічається робіт, де вивчався б розвиток і перебіг ХГДП неасоційованої з *H. pylori*. Не зважаючи на успіхи досягнуті в діагностиці, поодинокими залишаються дослідження, в яких аналізуються процеси клітинного відновлення серед дітей з ХГДП неасоційованою з *H. pylori*. В свою чергу, дослідження порушень процесів проліферації та апоптозу дозволило б прогнозувати ступінь ризику рецидиву ХГДП, поліпшити ранню діагностику та оптимізувати терапію цих захворювань.

Найближчим аналогом (прототипом) способу, що заявляється, є спосіб вивчення процесів апоптозу і проліферації при хронічному гастриті (ХГ) у

(13) U

(11) 58525

(19) UA

дітей [5]. За допомогою імуногістохімічного дослідження проведена оцінка клітинного відновлення епітеліоцитів СОШ у дітей при ХГ залежно від наявності інфекції *H. pylori*. В результаті проведеного дослідження, при *H. pylori* - асоційованому гастриті відмічали прискорення процесів клітинного відновлення епітеліоцитів шлунка у порівнянні з інтенсивністю процесів апоптозу і проліферації при *H. pylori* - неасоційованому ХГ. Однак ці дослідження не дають повної характеристики стану клітинного відновлення залежно від нозологічної форми гастриту і ступеня запального процесу в СОШ.

Задача корисної моделі полягає в створенні способу прогнозування структурних змін СО органів гастродуоденальної зони шляхом імуногістохімічного дослідження показників клітинного відновлення при ХГДП у дітей залежно від нозологічної форми гастродуоденальної патології, ступеня запальних змін СОШ та СОДПК.

Технічний результат, що досягається корисною моделлю, полягатиме в індивідуальному підході до розробки профілактичного лікування та зменшенні кількості рецидивів загострень ХГДП у дітей.

Поставлену задачу досягають тим, що у відомому способі, що включає дослідження процесів апоптозу і проліферації за допомогою імуногістохімічного аналізу згідно корисної моделі процеси проліферації та апоптозу визначають залежно від нозологічної форми гастродуоденальної патології та ступеня запальних змін слизової оболонки шлунка та 12-палої кишки, оцінюють співвідношення між активністю проліферації і апоптозу та розвитком відповідної форми гастриту та дуоденіту і при значному підвищенні проапоптозного показника ВАХ (більше 50 % позитивно пофарбованих клітин) та зниженні експресії антиапоптозного показника Bcl-2 (менше 10 % позитивно пофарбованих клітин) на фоні різних параметрів показника проліферації залежно від форм і ступеня запалення слизової оболонки органів гастродуоденальної зони при різних формах гастродуоденальної патології прогнозують прогресування запального процесу у слизовій оболонці шлунка і 12-палої кишки та рецидивуючий перебіг хронічної гастродуоденальної патології у дітей.

Відмінною особливістю способу, що заявляється, є врахування співвідношення між активністю проліферації і апоптозу у розвитку відповідної форми гастриту і дуоденіту. Дисбаланс процесів клітинного відновлення призводить до порушень фізіологічної регенерації слизової оболонки і є прогностичним показником виникнення рецидиву хронічного процесу з подальшим розвитком деструктивних змін з боку органів гастродуоденальної зони, порушень структури і архітекtonіки залоз шлунку та дванадцятипалої кишки.

Спосіб здійснюють наступним чином: Під нашим спостереженням перебувала 71 дитина віком від 8 до 16 років. Всім дітям під час фіброгастродуоденоскопії проводили біопсію СО фундального, антрального відділів та СОДПК. Для оцінки гістологічних змін СОШ та СОДГЖ тканинні зрізи фарбують гематоксиліном та еозином і пікрофуксином по Ван-Гизон. Імуногістохімічне дослідження ви-

конують на парафінових зрізах з використанням стрептавідин - пероксидазного методу (DAKO, Данія). Для оцінки клітинного гомеостазу використовували первинні моноклональні мишині антитіла до маркера ядерного антигену проліферуючих клітин (PCNA), до антиапоптозного білку bcl-2 і проапоптозного білка bax.

За результатами гістологічного обстеження серед хворих у 59 дітей діагностували неатрофічний гастрит, у 6 дітей - атрофічний гастрит, у 5 дітей - ерозивний гастрит, у 1 дитини - гранулематозний гастрит, у 51 дитини - неатрофічний дуоденіт, у 5 дітей - ерозивний дуоденіт, у 15 дітей - атрофічний дуоденіт.

Імуногістохімічні показники клітинного гомеостазу при неатрофічному гастриті характеризувалися збільшенням проліферативної активності, вираженої через збільшення поширеності експресії PCNA (від 2,5 % до 23 % позитивно пофарбованих ядер епітелію залоз) і підвищення апоптозу при збільшенні експресії ВАХ (більше 50 % позитивно пофарбованих клітин) зниженні експресії Bcl-2 (менше 10 % позитивно пофарбованих клітин). При ерозивних змінах СО органів ГДЗ відмічали помірне підвищення експресії PCNA (2,5-2,8 %) і підвищення апоптозу при збільшенні експресії ВАХ (більше 50 % позитивно пофарбованих клітин) і зниженні експресії Bcl-2 (менше 10 % позитивно пофарбованих клітин). Серед дітей з атрофічним гастритом були відмічені значні переважання проапоптозного показника ВАХ (більше 50 % позитивно пофарбованих клітин) при низькій експресії Bcl-2 (менше 10 % позитивно пофарбованих клітин) і низькій експресії PCNA (0-1 % позитивно пофарбованих ядер епітелію залоз). У хворих з атрофічним дуоденітом диспропорція клітинного відновлення характеризувалась підвищенням проліферативного показника PCNA (2-4 %) при помірній експресії ВАХ (більше 10 % позитивно пофарбованих клітин) і при низькій експресії Bcl-2 (менше 10 % позитивно пофарбованих клітин).

Таким чином, різне співвідношення між активністю проліферації і апоптозу обумовили розвиток відповідної форми гастриту і дуоденіту. При неатрофічному гастриті були відмічені незначні диспропорції в показниках клітинного гомеостазу, обумовлені зниженою експресією антиапоптозного показника Bcl-2. При підвищенні різниці між показниками проліферації і апоптозу в сторону підвищення експресії проапоптозного показника ВАХ при неатрофічному гастриті створюються умови для виникнення деструктивних змін СО ДПК. Формування атрофічного дуоденіту пов'язане з вираженим підвищенням індексу проліферації, зниженням антиапоптозного показника з помірною експресією проапоптозного потенціалу. При підвищенні індексу проліферації і зниженні апоптозної активності епітеліоцитів відбувається збільшення недеференційованих клітин, що не спроможні виконувати притаману їм функцію і це призводить до розвитку дистрофічних змін СО органів ГДЗ. Відмічена при атрофічному гастриті низька експресія PCNA при високій експресії ВАХ є діагностичним критерієм виникнення деструктив-

них змін з боку СОШ. Під час проведення імунногістохімічного дослідження були встановлені певні відмінності клітинного відновлення епітеліоцитів залежно від ступеня запальних змін СОШ.

Оцінка проліферативних процесів в СОШ показала, що у дітей експресія PCNA знаходиться в прямій залежності від ступеня запалення, що свідчить про структурні особливості дисрегенеративності. Середній рівень експресії PCNA епітеліоцитами шлунка при легкому ступені запалення складав 3,7 %. В той же час при вираженому запаленні СОШ експресії PCNA була достовірно вища - 7,8 %. При збільшенні ступеня запальних процесів відзначається виражена інфільтрація СОШ лімфоцитами, які, як відомо, приймають участь в регуляції клітинного відновлення і регенераторних процесах СО органів ГДЗ.

Таким чином, підвищення індексу проліферації відбувається при зростанні ступеня запалення СОШ, що перешкоджає нормальній репарації і сприяє тривалому хронічному запальному процесу в СО органів ГДЗ.

Аналіз апоптозної активності епітеліоцитів шлунка свідчить про дисбаланс про- і антиапоптозних білків. Нами був відмічений чіткий зв'язок антиапоптозного показника Bcl-2 зі ступенем запальних змін СОШ. При легкому ступені запалення СОШ рівень експресії Bcl-2 був вище (2 бали), чим при вираженому запаленні (1 бал). Рівень експресії проапоптозного білка BAX на відміну від Bcl-2 був вище (3 бали) і не залежав від ступеня запальних процесів СОШ. Згідно даним нашого дослідження, порушення клітинного відновлення епітеліоцитів СОШ пов'язані з низьким рівнем експресії антиапоптозного білка Bcl-2, що забезпечує тривалу персистенцію запального інфільтрату в СОШ і дозволяє прогнозувати перебіг ХГДП. Дослідження процесів клітинного відновлення в СОДПК показали ідентичні результати. Наші результати дослідження підтверджують дані літератури про поєднане ураження шлунка та ДПК у дитячому віці.

На основі проведеного імунногістохімічного дослідження перебіг ХГДП у дітей характеризується дисбалансом процесів клітинного відновлення, що призводить до порушень фізіологічної регенерації СО і є прогностичним показником виникнення рецидиву хронічного процесу з подальшим розвитком деструктивних і атрофічних змін з боку органів гастроудоденальної зони. Зважаючи на отримані результати, посилення апоптозної активності епітеліоцитів обумовлено порушенням співвідношення проапоптозного і антиапоптозного білків регуляції.

Приклади конкретного виконання запропонованого способу:

Дівчинка В., 15 років (медична карта № 3829) знаходилась на лікуванні в ДКП № 9 з 09.12.09 по 30.12.2009 з діагнозом: Хронічний гастродуоденіт (поверхневий неатрофічний гастрит, виражений ступінь запалення, поверхневий неатрофічний дуоденіт, II ступінь активності) з пониженою кислотоутворюючою функцією шлунка, стадія загострення. Скарги при поступленні: на голодний, ниючий біль в епігастральній та пілородуоденальній

ділянках, відрижку кислим, печію, нудоту, зниження апетиту, метеоризм, закрепи, слабкість, швидко втомлюваність. Анамнез виявив трьохрічну давність захворювання, п'ятиразове стаціонарне лікування у гастроентерологічних відділеннях з приводу загострення хронічного гастродуоденіту, обтяжений спадковий (за гастропатологією) анамнез, нераціональне харчування, паління з 13 років. Об'єктивно: вага - 52,0 кг, зріст - 164 см; шкіра бліда, «синці» під очима, помірно волога, чиста. Лімфовузли не пальпуються. Зів чистий, аускультативно - везикулярне дихання, ЧД - 19/хв. АТ - 90/60 мм рт. ст., Ps - 85 уд/хв. Тони серця звучні, чисті, ритмічні. Язик обкладений білим нашаруванням при корені. Живіт нормальних розмірів та конфігурації, при пальпації м'який, болючий в епігастральній та пілородуоденальній ділянках. Печінка біля краю реберної дуги. Селезінка не збільшена. Випорожнення через день.

Дані лабораторно-інструментальних методів дослідження: при проведенні лабораторних досліджень істотних змін не виявлено. ФЕГДС: еритематозна гастродуоденопатія. Інтрагастральна рН-метрія: В базальному періоді гіпоацидність, кислотонейтралізуюча функція декомпенсована. УЗД: Без патологічних змін. Гістологічне дослідження біоптату слизової оболонки фундального і антрального відділів шлунку та СОДПК: поверхневий неатрофічний гастрит, виражений ступінь запалення, поверхневий неатрофічний дуоденіт, II ступінь активності. Під час імунногістохімічного обстеження відмічали на фоні помірного підвищення експресії PCNA 2,7 %, значне підвищення проапоптозного показника BAX (більше 50 % позитивно пофарбованих клітин) і зниження експресії антиапоптозного показника Bcl-2 (менше 10 % позитивно пофарбованих клітин).

Інфекцію *Helicobacter pylori* за допомогою гістологічного і серологічного методів дослідження не встановлено. Бактеріологічне дослідження біоптату антрального відділу шлунку - умовно-патогенної мікрофлори не виявлено.

Призначено лікування: дієта стіл № 5, дуспалін 200 мг двічі на добу, панкреатин, дарсил, альтан. Больовий синдром та диспепсичні явища зникли на 3-й день захворювання, явища метеоризму - на 4-й, нормалізація випорожнень відбулася до кінця першого тижня лікування. Пальпаторна болючість в епігастральній ділянці зникла на 4-й день лікування.

Через 1 місяць після лікування під час ФЕГДС у дівчинки були відсутні ознаки запалення органів гастроудоденальної зони. При проведенні інтрагастральної рН-метрії реєстрували понижену кислотоутворюючу функцію шлунка на фоні декомпенсованої кислотонейтралізуючої функції шлунка. Гістологічне дослідження СОШ та СОДПК: хронічний поверхневий неатрофічний гастрит, легкий ступінь, хронічний неатрофічний дуоденіт, I ступінь. Імунногістохімічні показники залишалися без змін.

Через рік після проведеного лікування дитина надходить в стаціонар з скаргами на біль в животі, нудоту, закрепи. При ФГДС дослідженні були діагностовані ерозивні зміни слизової оболонки два-

надцятипалої кишки і еритематозний гастрит. Гістологічне дослідження біоптату слизової оболонки фундального і антрального відділів шлунку та СОДПК: поверхневий неатрофічний гастрит, виражений ступінь запалення, поверхневий неатрофічний дуоденіт, III ступінь активності. Під час імунногістохімічного обстеження не було відмічено змін параметрів клітинного відновлення, а саме зберігалася різниця між показниками проліферації і апоптозу в сторону підвищення експресії проапоптозного показника BAX і зниження показника Bcl-2.

Таким чином, конкретний наведений приклад демонструє вплив співвідношення між активністю проліферації і апоптозу на розвиток відповідної форми гастриту і дуоденіту. На фоні покращення клінічної симптоматики і позитивної морфологічної динаміки захворювання зберігається дисбаланс параметрів клітинного відновлення. В даному випадку отримані результати є прогностичними у виникненні рецидиву хронічного процесу з подальшим розвитком деструктивних змін з боку органів гастродуоденальної зони.

Спосіб апробовано в дитячій клінічній лікарні № 9 м. Києва з позитивними результатами і рекомендовано до впровадження у гастроентерологічні відділення дитячих лікарень.

Література:

1. Бельмер С.В., Хавкин А.И., Щербаков П.Л. Гастроэнтерология детского возраста. - М.: ИД «МЕДПРАКТИКА - М», 2010. - Т.2 - 476 с.

2. Волюнец Г.В., Клембовский А.И., Новико-

ва А.В. Морфологические изменения слизистой оболочки желудка у детей с хроническим гастритом в зависимости от этиологических факторов заболевания. // Российский педиатрический журнал. - 2006. - № 4. - с. 32-44.

3. Коваленко В.Л., Казачков Е.Л., Казимирова А.А. Значение некоторых ростовых факторов в патогенезе хронического гастрита у детей. // Архив патологии. - 2008. - № 2. - с. 3-5.

4. Осадчук А.М., Коган Н.Ю., Кветной И.М. Роль маркеров клеточного обновления и апоптоза эпителиоцитов при заболеваниях желудка, ассоциированных с *H. pylori* // Вестник Волгоградского гос. Ун-та. - 2007. - № 1. - с. 29-33.

5. Потрохова Е.А., Кононов А.В.. Клеточное обновление слизистой оболочки желудка при *H. pylori* - ассоциированном гастрите у детей // Клиническая медицина - 2004. - № 1. - с. 50-55.

6. Сорокина И.В., Страшок Л.А, Горголь Н.И // Гормональный статус и иммуногистохимические особенности формирования дуоденальной язвы в подростковом возрасте. - Теоретична та експериментальна медицина. - 2008. - № 1. - с. 61-65.

7. Munoz L, Camorlinga M., Hernandez R., et al. Immune and proliferative cellular responses to *Helicobacter pylori* infection in the gastric mucosa of Mexican children. *Helicobacter*. 2007; 12 (3): 224-30.

8. Zhang H, Fang D-C, Wang R-Q, Yang S-M, Liu H-F, Luo Y-H. Effect of *Helicobacter pylori* infection on expression of bcl-2 family members in gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 227-30.