

ФУКОЗОСПЕЦИФИЧНЫЙ БАКТЕРИАЛЬНЫЙ ЛЕКТИН В ИЗУЧЕНИИ МЕСТНОЙ ЗАЩИТЫ СЛИЗИСТОЙ ПРИ *H. PYLORI* – АССОЦИИРОВАННОЙ ДУОДЕНАЛЬНОЙ ЯЗВЕ

¹Государственный медицинский университет, г. Саратов,

²Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, г. Саратов

Язвенная болезнь по-прежнему является одной из наиболее актуальных проблем гастроэнтерологии. Это обусловлено широкой распространённостью заболевания, особенно среди лиц молодого возраста, высоким процентом осложнений и частым рецидивированием [3].

Известно, что *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) во многом определяет развитие данной патологии. Но, несмотря на разработанные эрадикационные схемы лечения, зачастую возникают трудности в подборе противорецидивной терапии. К настоящему времени накоплены данные о многочисленных факторах вирулентности бактерии, индуцирующих патогномичные изменения слизистой оболочки гастродуоденальной зоны [1, 8]. Так, обладая высокой подвижностью, *H. pylori* может локализоваться и в поверхностном эпителии антрального отдела желудка, и в слое свободной слизи. Микробные ферменты (уреаза, муциназа, липаза, каталаза) необходимы для создания оптимума обитания патогена за счёт повреждения слизистой. Значительную роль в язвообразовании играют и цитотоксины белковой природы *Cag A*⁺ и *Vac A*⁺. При хеликобактериозе модифицируется иммунный ответ макроорганизма, меняется местный гормональный фон. Гипергастринемия и подавление эффектов соматостатина приводят к усилению протеолиза [1]. Однако первоочередной этап в развитии хеликобактерной инфекции – это адгезия патогена. Главными рецепторами для бактерии являются фукозилированные компоненты слизистой [9]. Фукоза – одна из основных моносахаридных составляющих гликопротеинов (муцинов) слизевого барьера. Высокая степень гликозилирования этих соединений придаёт слизи вязкость, что обеспечивает механическую защиту. Присутствие фукозы определяет устойчивость и по отношению к протеазам [7, 10]. Уменьшение содержания фукозы в желудочной слизи при обострении язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки говорит о её значимой роли в нормальном функционировании слизевого барьера [1, 3]. Однако в доступной литературе практически нет сведений о распределении фукозосодержащих структур слизистой, несмотря на их участие в адгезии *H. pylori*.

Для выявления олигосахаридных компонентов тканей широко применяются гистохимические методы с применением лектинов – белков, обратимо и избирательно связывающих углеводные детерминанты [2]. Особого внимания заслуживают лектины, специфичные к одному углеводу. Действительно редкими являются фукозоспецифичные. В литературе описаны в основном растительные лектины [2]. Техническая трудность в получении этих чистых препаратов и их

токсичность обуславливают необходимость в подборе новых реагентов. Практически нет данных о диагностике воспалительных заболеваний гастродуоденальной системы с применением лектинов и работ по сравнению фукозоспецифичных лектинов различного происхождения. В связи с этим особый интерес вызывает лектин, специфичный к *L*-фукозе и *D*-галактозе, выделенный с поверхности почвенных азотфиксирующих бактерий *Azospirillum brasilense* Sp7 (*A. brasilense* Sp7), находящихся в ассоциативных взаимоотношениях с растениями [4]. Его отличительным преимуществом можно считать принадлежность к непатогенным бактериям, выраженную специфичность к *L*-фукозе, отсутствие токсичности и относительную простоту в технологии получения.

Цель исследования – оценка характера изменений слизистой антрального отдела желудка при *H. pylori* – ассоциированной дуоденальной язве методом лектиновой гистохимии, а также сравнение действия лектина бактерий *A. brasilense* Sp7, специфичного к *L*-фукозе и *D*-галактозе, и фукозоспецифичного растительного лектина бобовника анагириolistного (*Laburnum anagyroides* [LAL]).

Клиническая характеристика обследованных больных. В ходе работы были сформированы 4 группы пациентов: 30 человек с обострением язвенной болезни двенадцатиперстной кишки (ЯБДК (о), 20 человек с ремиссией по данному заболеванию ЯБДК (р), 20 человек с хроническим гастритом (ХГ А+В) и 15 человек – здоровых лиц. Диагноз подтверждали эндоскопически. Большинство больных было моложе 50 лет (90%). Соотношение мужчин и женщин вне зависимости от возраста составило 2,3:1.

Материалы и методы исследований

В работе использованы лектины бактериального и растительного происхождения. Основным маркером представлен лектином поверхности азотфиксирующих бактерий *A. brasilense* Sp7 со строгой специфичностью к *L*-фукозе, а также к *D*-галактозе. Для его выделения использовали модифицированный нами метод Eshdat Y. et al [6]. Очистку белка проводили гелефильтрацией на колонке с сефадексом G-75 с регистрацией выхода белковых фракций на приборе Uvicord SI I (LKB, Швеция) при 278 нм. Очищенный лектин метили флуоресцентным красителем – флуоресцеинаизотиоцианатом (ФИТЦ). ФИТЦ-производное получали путем центрифугирования раствора, содержащего 0,5 мг очищенного лектина и 10 мг красителя, в фосфатно-солевом буфере (рН = 7,4), добавляя холодный ацетон. Операцию повторяли до тех пор, пока надосадочная жидкость

не становилась бесцветной. Конечный осадок растворяли в фосфатно-солевом буфере и хранили в холодильнике.

В качестве растительного лектина был использован лектин коры бобовника анагирилистного (*LAL*), специфичный к α – L-фукозе, и его конъюгат с ФИТЦ, являющиеся коммерческими препаратами (г. Львов, «Лектинотест»).

В ходе эндоскопического исследования осуществляли забор биопсийного материала из антрального отдела желудка. В каждом случае получали по 3 биоптата для гистологической оценки изменений слизистой и соскоб для цитологического определения степени обсеменения *H. pylori*. При подготовке образцов к гистологическому и гистохимическому исследованиям использовали метод заливки тканей в полиэтиленгликоль 1500 (ПЭГ). Обработку срезов лектинами проводили по методу М. Д. Луцка [2]. Из образцов тканей каждой группы обследованных готовили несколько серий срезов для обработки: ФИТЦ – меченным лектином коры бобовника, ФИТЦ – меченным лектином азоспирилл в различных концентрациях, а также гаптенами лектиновой активности. В качестве контроля использовали неокрашенные срезы. Рабочие концентрации опытных лектинов: для лектина *A. brasiliense* Sp 7 – 12,5; 25 и 50 мкг/мл, для лектина коры бобовника (*LAL*) – 12,5 мкг/мл. Микроскопию препаратов с флуоресцентной меткой проводили на люминесцентном микроскопе Leica DMLB (Германия). Для работы использовали зелёный светофильтр ($\lambda_{EX} < 480$ нм, $\lambda_{FL} > 550$ нм). Локализацию метки определяли по наличию жёлтого свечения. С помощью программы MathCad проводили обработку цифрового изображения гистологических срезов. По отношению площади свечения метки к общей площади среза высчитывали коэффициент связывания лектина, меченного флуорохромом. При обработке материала определялись средние значения, ошибка, доверительный интервал. При сравнении показателей между различными группами использовался критерий Стьюдента (*t*).

Результаты и обсуждение

При гистологическом анализе образцов тканей как больных ХГ А+В, так и ЯБДК, вне зависимости от стадии заболевания были выявлены признаки хронического воспаления (табл. 1). В подавляющем боль-

шинстве случаев определялись признаки неатрофического гастрита. Атрофический гастрит диагностирован несколько реже. Ни в одном из гистологических препаратов дисплазия слизистой не была выявлена. Что касается метаплазии по тонкокишечному типу, то этот признак на фоне хронического воспаления чаще отмечался при ЯБДК, чем в отсутствие язвообразования. Редкой находкой была гиперплазия лимфатических фолликулов со светлыми центрами, один из которых соответствовал эндоскопической картине зернистой гиперплазии слизистой.

По данным цитологического исследования пристеночной слизи при ЯБДК (о) *H. pylori* выявлен в 86,7% случаев (26 человек), несколько реже в ремиссию (у 10 пациентов), то есть в 50% ($p < 0,0001$). *H. pylori*-позитивными были 40% больных с ХГ А+В (8 человек). И лишь у 20% здоровых (3 человека) обнаружены хеликобактерии. Таким образом, в большинстве случаев обострение ЯБДК было *H. pylori*-ассоциированным. У всех *H. pylori*-позитивных лиц вне зависимости от нозологии превалировала II степень микробного обсеменения: 14 человек с ЯБДК (о) (46,7%), 5 – ЯБДК (р) (25%) и 4 человека с ХГ А+В (20%).

При цифровой обработке микрофотографий срезов определяли коэффициенты связывания лектинов (табл. 2). Наибольшим этот показатель был при обработке неизменённой слизистой. Наименьшим – в образцах с ЯБДК (о) ($p < 0,0001$). По остальным группам получены промежуточные значения. К здоровым приближены показатели ХГ А+В и ЯБДК (р) ($p > 0,05$). Таким образом, лучше всего связывание лектина происходило в отсутствие патологии, то есть у здоровых лиц. В то же время наличие дуоденальной язвы сопровождается выраженными морфологическими изменениями антрума и низким связыванием фукозоспецифичного лектина. Это говорит об уменьшении числа фукозилированных структур в слизистой антрального отдела желудка при *H. pylori*-зависимом обострении ЯБДК. При сравнении двух различных лектинов в одинаковой концентрации 12,5 мкг/мл различия оказались недостоверны ($p > 0,05$) (табл. 2). Это может быть объяснено более выраженной специфичностью бактериального лектина к L-фукозе, несмотря на специфичность и к D-галактозе. Из используемых концентраций лектина *A. brasiliense* лучший результат получен при 50 мкг/мл.

Таблица 1

Морфологические особенности слизистой антрального отдела желудка у больных ЯБДК, ХГ А+В и у здоровых лиц

Характер изменений слизистой	ЯБДК (о) N = 30	ЯБДК (р) N = 20	ХГ А+В N = 20	Здоровые N = 15
Неатрофический гастрит	22 (73,3%)	15 (75%)	12 (60%)	0
Атрофический гастрит	8 (26,7%)	5 (25%)	8 (40%)	0
Кишечная метаплазия	12 (40%)	9 (45%)	5 (25%)	0
Дисплазия эпителия	0	0	0	0
Наличие лимфатических фолликулов	1 (3,3%)	0	1 (5%)	0
Отсутствие гастрита	0	0	0	15 (100%)

Влияние концентрации лектинов на показатель связывания с фукозосодержащими рецепторами слизистой

Концентрации лектинов	Группы больных			
	Здоровые N = 15	ЯБДК (о) N = 30	ЯБДК (р) N = 20	ХГ А+В N = 20
Контроль (без лектина)	15,9±0,8	11,9±0,6	13,9±0,7	13,4±0,7
Лектин LAL 12,5 мкг/мл	35,8±1,8	22,4±1,1	29,8±1,4	37,5±1,5
Лектин <i>A. brasiliense</i> 12,5 мкг/мл	40,5±1,6	23,1±0,9	28,5±1,2	38,5±1,5
Лектин <i>A. brasiliense</i> 25 мкг/мл	49,7±1,8	27,8±1,1	35,2±1,4	47,5±1,9
Лектин <i>A. brasiliense</i> 50 мкг/мл	64,1±2,2	31,8±1,6	41,3±2,0	55,6±2,3

Нами был проведён сравнительный анализ показателей связывания бактериального лектина в концентрации 50 мкг/мл в присутствии гаптен: L-фукозы (1,87 Мм/л), D-галактозы (20 Мм/л) и их смеси. Так, фукоза ослабляла связывание лектина примерно на 40–45% независимо от нозологии ($p < 0,0001$). Неполное ингибирование может быть обусловлено немаловажной ролью гидрофобных механизмов связывания лектинов [2, 4]. Не было выявлено значимого эффекта галактозы.

Таким образом, у большинства обследованных больных были выявлены морфологические признаки хронического воспаления с лимфоидной и нейтрофильной инфильтрацией, частое обнаружение кишечной метаплазии, реже – железистой атрофии. Высок процент бактериального обсеменения среди больных. Наиболее выраженные изменения слизистой и частое выявление *H. pylori* были в образцах ткани при ЯБДК (о). Этим подчёркивается участие хеликобактериоза в механизмах ульцерогенеза с формированием гастрита, кишечной метаплазии и атрофии.

Результаты наших исследований согласуются с немногочисленными литературными данными по лектингистохимическому изучению слизиобразования при хронических гастродуоденальных заболеваниях. Исследования в педиатрии с применением набора растительных лектинов показали снижение активности синтеза фукозилированных и сиалированных гликопротеинов при обострении ЯБДК [5]. По нашим данным, имеет место уменьшение не только фукозы желудочной слизи при обострении язвенной болезни, но и фукозы в составе рецепторов желудочного эпителия. *H. pylori* приводит к усилению кислотно-протеолитической агрессии, ослабляя слизевую защиту, что приводит к деструкции слизистой. Начальным этапом инфекционного процесса является микробная адгезия, медируемая фукозилированными структурами слизистой. В то же время гликопротеины желудка, в частности фукозосодержащие, опре-

деляют протективные свойства слизевого барьера. Количественное уменьшение их в антральном отделе в аспекте хеликобактериоза может носить защитный характер.

Поступила 23.01.2008

ЛИТЕРАТУРА

1. Аруин Л. И., Капуллер Л. Л., Исаков В. А. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника. М.: Триада-Х, 1998. 496 с.
2. Луцки А. Д., Детюк Е. С., Луцки М. Д. Лектины в гистохимии. Львов: Вища школа, 1989. 144 с.
3. Маев И. В., Самсонов А. А. Болезни двенадцатиперстной кишки. М.: МЕДпресс-информ, 2005. 512 с.
4. Никитина В. Е., Аленькина С. А., Итальянская Ю. В., Пономарёва Е. Г. Очистка и сравнение лектинов с клеточной поверхности активных и неактивных по геммагглютинации клеток азоспирилл // Биохимия, 1994. Т. 59, вып. 5. С. 656–662.
5. Степанов С. А., Гроздова Т. Ю., Кучук С. А., Черненко Ю. В. Состояние слизиобразующего аппарата желудка и двенадцатиперстной кишки у детей при гастродуоденальной патологии // Арх. патологии, 1994. Т. 56, № 3. С. 36–38.
6. Eshdat Y., Ofek I., Yachow-Yan Y., Sharon N., Mirelman D. Isolation of a mannose-specific lectin from *Escherichia coli* and its role in the adherence of the bacteria to epithelial cells // Biochem. Biophys. Res. Commun., 1978. V. 85. P. 1551–1559.
7. Flemström G., Isenberg J. I. Gastroduodenal Mucosal Alkaline Secretion and Mucosal Protection // News Physiol. Sci., 2001. V. 16. P. 23–28.
8. Tianshu L., Jiyao W., Shiyao C. and Fan Y. Pathological development of the gastric mucosa in *Helicobacter pylori* – related diseases // Chinese J. of Digestive Diseases. 2001. № 2. P. 167–170.
9. Van de Bovenkamp J. H. B., Mahdavi J., Korteland-Van Male A. M. The MUC5AC glycoprotein is the Primary Receptor for *Helicobacter pylori* in the Human Stomach // *Helicobacter*, 2003. V. 8, № 5. P. 521–532.
10. Werther J. L. The Gastric Mucosal Barrier // The mount sinai journal of medicine, 2000. V. 67, № 1. P. 41–53.

M. V. POTAPOVA, V. B. LIFSHITS,
V. E. NIKITINA, H. G. PONOMAREVA

**BACTERIAL FUCOSE – SPECIFIC LECTIN
IN ASSESSMENT OF MUCOSA PROTECTION AT
H. PYLORI-ASSOCIATED DUODENAL ULCER**

H. pylori can directly and indirectly influence the chance of pathogenesis of ulcer disease. Destructive changes of the mucosa appear after microbial adhesion. The main bacterial receptors

are considered fucosylated components of mucosa. Thus, fucose is an ultrastructural component of gastroduodenal protection and mediator of H. pylori – invasion as well. It causes a histochemical research of a mucous membrane with the help of fucolectins, which is absolutely relevant. We have revealed the reduction of a level of antrum fucosylated structures in an aggravation of peptic ulcer. Lectin of a bacterial origin has a number of advantages to compare with plant by its character reference.

Л. В. САВИНА, Т. В. ЛУКОШНИКОВА, С. В. БУТАЕВА

ДИАГНОСТИКА СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЕ ПРИ АУТОИММУННОМ ТИРЕОИДИТЕ

*Кафедра терапии № 1 факультета усовершенствования врачей
Кубанского государственного медицинского университета*

Наиболее частой причиной морфофункциональных изменений щитовидной железы (ЩЖ) с последующим развитием гипотиреоза является аутоиммунный тиреоидит (АИТ) с последующим развитием гипотиреоза [2], в связи с чем разработка диагностических методов исследования структуры ЩЖ на ранних этапах заболевания по-прежнему актуальна.

Любой орган, функционирующая клетка являются источником и носителем электромагнитного излучения, ритм которого меняется в зависимости от интенсивности хода обменных процессов [3].

Для регистрации электромагнитного излучения живых объектов применяют биологические жидкие кристаллы (ЖК), обладающие высокой оптической активностью и способностью к передаче информационной структуры [1].

Целью данного исследования явилась разработка биологической тест-системы (БТС), обладающей свойствами ЖК, для регистрации энергетического излучения ЩЖ и диагностики структурных изменений в ней при АИТ.

Материалы и методы

Обследовано 65 женщин в возрасте от 20 до 45 лет, из них у 32 была гипертрофическая форма АИТ с манифестным гипотиреозом, у 13 – с субклиническим гипотиреозом, и 20 практически здоровых женщин. Давность заболевания составила от 1 года до 6 лет.

Всем больным проводили общепринятые общеклинические, лабораторные и инструментальные исследования. Изучали: тиреоидный статус с использованием иммунодиагностической системы «Амерлайт» фирмы Amersham – определение в сыворотке крови свободного трийодтиронина (св T_3), свободного тироксина (св T_4), тиреотропного гормона (ТТГ); антитела к тиреоглобулину, к тиреоидной пероксидазе; проводили тонкоигльную пункционную биопсию ЩЖ. Осуществляли ультразвуковое сканирование щитовидной железы на ультразвуковом сканере GE Vingmed System Five с использованием высокочастотного датчика 7,5 МГц. Объем щитовидной железы (V жел., см³) рассчитывали по

формуле J. Brunn (1981): $V \text{ жел.} = [(T_1 \times \text{Щ}_1 \times D_1) \text{ справа} + (T_2 \times \text{Щ}_2 \times D_2) \text{ слева} \times 0,479]$, где T – толщина доли; Щ – ширина доли; D – длина доли [3]. Для получения количественной характеристики органного кровотока использовали режим импульсного доплера [4]. Контрольный объем устанавливался на нижнещитовидную артерию, изображение которой было получено в режиме цветового доплеровского картирования. Использовались следующие количественные характеристики доплеровского спектра: максимальная систолическая скорость кровотока ($V \text{ max}$, см/с), конечная диастолическая скорость кровотока ($V \text{ min}$, см/с), пульсаторный индекс (P_i , у. е.), резистивный индекс Пурсилота (R_i , у. е.).

БТС состояла из 0,1%-ного водного раствора 10 аминокислот (лейцин, глицин, пролин, серин, фенилаланин, гистидин, оксипролин, аргинин, глутаминовая, аспарагиновая), 0,5%-ного водного раствора нейромедиаторов – дофамина и гистамина, 12%-ного водного раствора сернокислой магнезии. Соотношение аминокислот нейромедиаторов и сернокислой магнезии составило 4:1:5. БТС объемом 0,05–0,06 мл наносили на стеклянную пластину в виде тонкой пленки. Затем пластину помещали на исследуемый участок кожи (зона проекции долей и перешейка щитовидной железы), выдерживали 5–7 минут. Полученный препарат высушивали в термостате при $T = +35\text{--}40^\circ \text{C}$ на протяжении 2–3 минут, изучали его структуру в поляризационном свете (микроскоп – Мин-8) [6, 7].

Статистический анализ проводили по программе «STATISTICA 5.0 for Windows». Статистические различия средних в парных сравнениях проверяли по t -критерию для зависимых выборок.

Результаты и их обсуждение

Микроскопическое исследование препаратов, полученных при регистрации излучения ЩЖ, обнаружило их высокую оптическую активность – наличие пестрых цветов интерференционной окраски по шкале Мишель-Леви [5]. При исследовании структуры БТС выделены селективные микротипы, присущие для ЩЖ здорового человека и АИТ. Приводим исходную структуру БТС,