

# ВИЯВИ ОКИСНОГО СТРЕСУ В СЛИЗОВІЙ ОБОЛОНЦІ ШЛУНКА ХВОРИХ ІЗ ПЕПТИЧНОЮ ВИРАЗКОЮ ДВАНАДЦЯТИПАЛОЇ КИШКИ ПІСЛЯ УСПІШНОЇ ЕРАДИКАЦІЇ *HELICOBACTER PYLORI*

*А.П. Черкас, Х.О. Семен, О.П. Єлісєєва, Д.В. Камінський, М.М. Лазуренко, О.Я. Яцкевич, О.О. Абрагамович*

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького  
Новояворівська районна лікарня № 1

**Ключові слова:** 4-гідроксиноненаль, окисний стрес, *Helicobacter pylori*, ерадикація, пептична виразка дванадцятипалої кишки.

На сьогодні ерадикація *Helicobacter pylori* стала головною стратегією лікування пептичної виразки дванадцятипалої кишки (ПВДПК) та інших хвороб травного каналу, асоційованих із цим мікроорганізмом. Ліквідація інфекції розглядається як важливий чинник зниження ризику аденокарциноми шлунка [14]. *H. pylori* спричинює гемотаксис нейтрофілів та моноцитів, звільнення значної кількості активних форм кисню (АФК), насамперед супероксид аніону, зумовлюючи, таким чином, розвиток запалення. Надмірна активація вільнорадикальних реакцій та ліпопероксидації запускає в організмі низку метаболічних каскадів, спрямованих на адаптацію до дії пошкоджувальних чинників. Саме інтенсивність дії пошкоджувального чинника (*H. pylori*) та сила захисних механізмів макроорганізму визначає наслідок взаємодії, що може варіювати від безсимптомного носійства до виразки чи навіть раку шлунка [9, 10, 14, 16].

Вагома роль у розвитку цих патологій належить окисному стресові, який виникає в умовах надмірної ліпопероксидації на тлі зниженого антиоксидантного захисту і, як наслідок, зумовлює нагромадження продуктів окисної деструкції макромолекул у слизовій оболонці шлунка (СОШ) [12, 13, 15—19]. Найбільше вивченим на сьогодні маркером окисного стресу є 4-гідрокси-2,3-транс-ноненаль (4-ГН), вторинний продукт ліпопероксидації омега-6 жирних кислот [20, 22, 23]. Однак у фізіологічних концентраціях 4-ГН є важливою сигнальною молекулою і регулює процеси диференціації, проліферації, апоптозу, запалення та енергетичного метаболізму [20, 22, 23].

Сучасні імуногістохімічні методи дають змогу специфічно оцінювати вміст та розподіл 4-ГН у тканинах організму, локально, навіть на рівні окремих клітин та органел, виявляти ознаки окисного стресу. Мета роботи — вивчити вміст та розподіл 4-ГН у СОШ хворих на *H. pylori*-асоційовану ПВДПК і його зміни після стандартного лікування.

## Матеріали та методи дослідження

Обстежено 29 хворих з активною ПВДПК віком від 18 до 44 років (середній вік  $M \pm m$ ,  $(32,1 \pm 1,7)$  року, 18 чо-

ловіків та 11 жінок). Діагноз встановлено після загального клінічного та ендоскопічного дослідження. Усі хворі отримували потрійну терапію за схемою: лансопризол — по 30,0 мг, амоксицилін — по 1,0 г та кларитроміцин — по 0,5 двічі на добу протягом 7 днів. Контрольну групу склали 20 умовно здорових волонтерів (вік  $M \pm m$ , 29,7 року  $\pm 1,4$  року, 12 чоловіків та 8 жінок). Жоден з обстежених не вживав  $H_2$ -гістамінових блокаторів, інгібіторів протонної помпи, препаратів вісмуту, антибіотиків, нестероїдних протизапальних засобів чи кортикостероїдів не менше ніж за місяць до початку дослідження. Інформовану згоду у кожного обстеженого отримано перед уведенням у дослідження, затверджене Етичним комітетом Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького.

По два зразки тканини для гістологічного та імуногістохімічного дослідження отримано із тіла та антрального відділів шлунка під час ендоскопічного дослідження. Одразу ж після взяття матеріал фіксували у 10,0% формаліні, потім дегідрували в етанолі і поміщали у парафінові блоки. Зрізи для рутинного гістологічного дослідження забарвлювали гематоксиліном та еозином, для виявлення *H. pylori* — за методом Гімзи [7]. Додатково один біоптат з антрального відділу отримували для проведення швидкого уреазного тесту. Запалення, мікробне обсіменіння *H. pylori*, залозисту атрофію, дисплазію та кишкову метаплазію оцінювали якісно («0» — негативно і «1» — позитивно) і напівкількісно, відповідно до переглянутої Сіднейської класифікації («0» — немає ознаки, «1» — слабо виражена, «2» — середній ступінь виразності, «3» — виразна сильно) [1].

Репрезентативна вибірка парафінових блоків (21 від *H. pylori*-позитивних хворих на ПВДПК та 20 від умовно здорових волонтерів — 8 *H. pylori*-позитивних і 12 негативних) взята для імуногістохімічного дослідження, яке проводили з використанням набору LSAB kit (DAKO, Данія) та специфічних моноклональних антитіл до 4-ГН [21].

Досліджувані параметри у СО шлунка порівнювали за допомогою тесту  $\chi^2$  після визначення ознаки як позитивної чи негативної.

**Результати та їхнє обговорення**

Серед обстежених 29 хворих на ПВДПК *H. pylori* виявили у 21 (72,4%). Їх і відібрали для подальшого обстеження. У контрольній групі *H. pylori*-позитивними були 8 осіб (40%). Гістологічно у них виявляли ознаки хронічного неатрофічного гастриту типу В, тоді як у переважної кількості *H. pylori*-негативних волонтерів жодної патологічної зміни не виявлено. Ознаки запалення виявляли значно частіше у *H. pylori*-позитивних хворих порівняно із контрольною групою (табл. 1). Домінантним виявом запалення була макрофагальна інфільтрація, тоді як збільшення кількості нейтрофілів у слизовій оболонці спостерігалось значно рідше. Через 4—5 тиж після застосування ерадикаційної схеми лікування *H. pylori* виявили у 2 (9,5%) хворих, що свідчить про задовільну ефективність лікування, співмірну із описуваними в сучасній літературі [12, 19]. Слід зазначити, що ефективна ерадикація *H. pylori* забезпечувала практично повну ліквідацію виявів запалення у СОШ (див. табл. 1). Проте у літературі нерідко зустрічаються повідомлен-

ня про залишкові морфофункціональні зміни у СОШ після успішної ерадикації *H. pylori* [2, 11, 12].

Під час імуногістохімічного дослідження біоптатів слизової оболонки тіла та антрального відділів шлунка виявлено значно виразніше нагромадження 4-ГН у хворих порівняно з контролем (табл. 2; рис. 1). Особливо слід вказати на наявність 4-ГН у ядрах гландулоцитів власних залоз шлунка багатьох хворих, хоча у жодного волонтера таких змін не виявлено. Надмірне нагромадження 4-ГН, особливо у ядрах клітин, які зазвичай добре захищені від дії вільних радикалів та продуктів ліпопероксидації, свідчить про виснаження антиоксидантного захисту та ознаки локального окисного стресу. Така метаболічна ситуація супроводжується значним пошкодженням макромолекул, в тому числі ДНК, і є важливим елементом патогенезу не тільки ПВДПК, а й *H. pylori*-індукованого канцерогенезу [14]. Визначення 4-ГН після ерадикації *H. pylori* виявило дещо несподівані результати. Як у антральному відділі, так і в тілі шлунка, нагромадження 4-ГН практично не зазнало змін, а в окремих паціє-

**Таблиця 1. Інфікованість *H. pylori* та результати гістологічного дослідження слизової оболонки шлунка в умовно здорових волонтерів (n = 20) та хворих на ПВДПК (n = 21)**

Параметр	Контрольна група		Хворі на ПВДПК до лікування		Хворі на ПВДПК після лікування	
	Анtrum	Тіло	Анtrum	Тіло	Анtrum	Тіло
<i>H. pylori</i>	8 (40,0%)	7 (35,0%)	21 (100%)***	19 (90,5%)***	2 (9,5%)***	2 (9,5%)* ##
Нейтрофіли	2 (10,0%)	2 (10,0%)	5 (23,8%)	3 (14,3%)	0 #	0
Моноцити	8 (40,0%)	7 (35,0%)	21 (100%)***	21 (100%)***	2 (9,5%)*	2 (9,5%)*
Атрофія	0	0	2 (9,5%)	3 (14,3%)	1 (4,8%)	2 (9,5%)
Метаплазія	0	0	1 (4,8%)	0	1 (4,8%)	0
Дисплазія	0	0	1 (4,8%)	0	0	0
Лімфоїдні фолікули	2 (10,0%)	2 (10,0%)	7 (33,3%)	5 (23,8%)	1 (4,8%) #	0 #

Примітка. \* Різниця з контрольною групою вірогідна ( $P < 0,05$ ). \*\* Різниця з контрольною групою вірогідна ( $P < 0,01$ ). \*\*\* Різниця з контрольною групою вірогідна ( $P < 0,001$ ). # Різниця до та після лікування вірогідна ( $P < 0,05$ ). ## Різниця до та після лікування вірогідна ( $P < 0,001$ ).

**Таблиця 2. Вміст та розподіл 4-ГН у слизовій оболонці шлунка в умовно здорових волонтерів (n = 20) та *H. pylori*-позитивних хворих з ПВДПК (n = 21)**

Параметр	Контрольна група		Хворі на ПВДПК до лікування		Хворі на ПВДПК після лікування	
	Анtrum	Тіло	Анtrum	Тіло	Анtrum	Тіло
Поверхневий епітелій	2 (10,0%)	0	7 (33,3%)	15 (71,4%)***	8 (38,1%)*	6 (28,6%)***
Ямковий епітелій	1 (5,0%)	0	10 (47,6%)**	10 (47,6%)***	8 (38,1%)*	17 (81,0%)***
Власна пластинка	7 (35,0%)	8 (40,0%)	16 (76,2%)**	16 (76,2%)*	17 (81,0%)**	20 (95,2%)***
Цитоплазма гландулоцитів	20 (100%)	19 (95,0%)	21 (100%)	21 (100%)	19 (90,5%)	21 (100%)
Ядра гландулоцитів	0	0	9 (42,9%)***	4 (19,0%)*	8 (38,1%)**	9 (42,9%)***

Примітка. \* Різниця з контрольною групою вірогідна ( $P < 0,05$ ). \*\* Різниця з контрольною групою вірогідна ( $P < 0,01$ ). \*\*\* Різниця з контрольною групою вірогідна ( $P < 0,001$ ). # Різниця до та після лікування вірогідна ( $P < 0,05$ ). ## Різниця до та після лікування вірогідна ( $P < 0,01$ ).

ентів навіть збільшилося. Лише у поверхневому епітелії тіла шлунка вміст 4-ГН вірогідно зменшився, очевидно, внаслідок припинення патогенної дії *H. pylori*. Важливо, що нагромадження 4-ГН у ядрах гландулоцитів не тільки не зменшилося, й мало тенденцію до збільшення (див. табл. 2), що свідчить про персистенцію окисного стресу у СОШ після ерадикації *H. pylori*.

Отже, такі відомі факти, як «синдром повернення клініки», зростання частки *H. pylori*-негативних дуоденальних виразок, персистенція окисного стресу у СОШ навіть після успішної ерадикації, вказують на кончу потребу в доповненні стандартного лікування ПВДПК засобами корекції окисного стресу. У цьому контексті на особливу увагу заслуговує можливість застосування природних засобів, які активізують окисно-відновні реакції і тому здатні ефективно ліквідувати вияви окисного стресу. Серед них — олія з насіння амаранта, омега-3 поліненасичені жирні кислоти, інтервальне гіпоксичне тренування тощо, ефективність яких у підвищенні потужності функціонально-метаболического резерву обґрунтована і продемонстрована у багатьох дослідженнях [3—6, 8].

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Аруин Л.И., Капуллер Л.Л., Исаков В.А. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника.— М.: Трида-Х, 1998.— 496 с.
2. Вдовиченко В.І., Швидкий Я.Б. Післяерадикаційний синдром: міф чи реальність? // Сучасна гастроентерологія.— 2001.— № 3.— С. 16—17.
3. Єлісеєва О.П., Камінський Д.В., Черкас А.П. та ін. Особливості впливу олії з насіння амаранта на стан антиоксидантної системи печінки та крові мишей за розвитку в них злоякісної лімфоми // Укр. біохім. журн.— 2006.— Т. 78, № 1.— С. 117—123.
4. Єлісеєва О.П., Семен Х.О., Черкас А.П. та ін. Особливості механізмів індивідуально дозованого гіпоксично-гіперкапічного впливу на варіабельність ритму серця спортсменів // Фізіол. журн.— 2007.— Т. 53, № 4.— С. 77—85.
5. Єлісеєва О.П., Сергієнко О.О., Черкас А.П. та ін. Комплексна оцінка впливу олії з насіння амаранта на функціонально-метаболический резерв у хворих на цукровий діабет 1-го типу // Вісн. Львівського університету: Серія біологічна.— 2007.— Вип. 44, № 3.— С. 135—145.
6. Єлісеєва О.П., Черкас А.П., Семен Х.О. та ін. Оптимізація параметрів аеробного метаболізму, варіабельності серцевого ритму та посилення кореляційних зв'язків між ними під впливом олії з насіння амаранту в атлетів // Експед. та клін. фізіол. і біохім.— 2006.— № 4.— С. 68—77.
7. Микроскопические техники / Под ред. Д.С. Саркисова, Е.Л. Перова.— М.: Медицина, 1996.— 544 с.
8. Тимочко М.Ф., Єлісеєва О.П., Кобилінська Л.І., Тимочко І.Ф. Метаболічні аспекти формування кисневого гомеостазу в екстремальних станах.— Львів: Місіонер, 1998.— С. 142.
9. Черкас А.П., Семен Х.О., Єлісеєва О.П. та ін. Особливості параметрів варіабельності ритму серця та гістологічної структури слизової оболонки шлунка залежно від інфікованості *Helicobacter pylori* у хворих на виразкову хворобу дванадцятипалої кишки та умовно здорових волонтерів // Сучасна гастроентерологія.— 2006.— № 4 (30)— С. 44—49.
10. Bi L.C., Kaunitz J.D. Gastrointestinal mucosal defence: an integrated protective response // Curr. Opin. Gastroenterol.— 2003.— Vol. 19 (6)— P. 526—532.
11. Everett S.M., Singh R., Leuratti C. et al. Levels of malondialdehyde-deoxyguanosine in the gastric mucosa: relationship with

#### Висновки

Успішна ерадикація *H. pylori* не забезпечує зменшення виявів окисного стресу (за вмістом та розподілом 4-ГН) у слизовій оболонці шлунка через 4—5 тиж після лікування, попри виразне поліпшення гістологічної структури і ліквідацію запалення.

#### Перспективи подальших досліджень

Перспективним є дослідження впливу природних засобів корекції окисного стресу на рівні СОШ та цілого організму в комплексному лікуванні пацієнтів з ПВДПК чи іншими *H. pylori*-асоційованими хворобами травної системи.

*Робота виконана в рамках програми Європейського Союзу European cooperation in the field of science and technical research, проект COST B35 Action («LPO: Lipid peroxidation associated disorders»).* Автори висловлюють вдячність проф. Н. Зарковічу (Інститут Руджера Босковича, Загреб, Хорватія) та проф. К. Зарковічу (Клінічний центр і медичний факультет Загребського університету, Загреб, Хорватія) за значну допомогу у проведенні імуногістохімічних досліджень.

- lipid peroxidation, ascorbic acid, and *Helicobacter pylori* // Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.— 2001.— Vol. 10.— P. 369—376.
12. Felley C.P., Pignatelli B., Van Melle G.D. et al. Oxidative stress in gastric mucosa of asymptomatic humans infected with *Helicobacter pylori*: effect of bacterial eradication // *Helicobacter*.— 2002.— Vol. 7 (6)— P. 342—348.
  13. Khaled M.A., Sarker S.A. Changes of oxidant and antioxidant status in humans due to *H. pylori* infection // *Nutr. Res.*— 1998.— Vol. 18 (9)— P. 1463—1468.
  14. Konturek P.C., Konturek S.J., Brzozowski T. Gastric cancer and *Helicobacter pylori* infection // *J. Physiol. Pharmacol.*— 2006.— Vol. 57, Suppl. 3.— P. 51—65.
  15. Li C.-Q., Pignatelli B., Ohshima H. Increased oxidative and nitrate stress in human stomach associated with *cagA+* *Helicobacter pylori* infection and inflammation // *Dig. Dis. Sci.*— 2001.— Vol. 46 (4)— P. 836—844.
  16. Manjari V., Das U.N. Oxidant stress, antioxidants, nitric oxide and essential fatty acids and peptic ulcer disease // *Prostaglandins, Leukotriens and Essential Fatty Acids*.— 1998.— Vol. 59 (6)— P. 401—406.
  17. Mashimo M., Nishikawa M., Higuchi K. et al. Production of reactive oxygen species in peripheral blood is increased in individuals with *Helicobacter pylori* infection and decreased after its eradication // *Helicobacter*.— 2006.— Vol. 11.— P. 266—271.
  18. Oh T.Y., Yeo M., Han S.U. et al. Synergism of *Helicobacter pylori* infection and stress on the augmentation of gastric mucosal damage and its prevention with  $\alpha$ -tocopherol // *Free Radical Biol. Med.*— 2005.— Vol. 38.— P. 1447—1457.
  19. Pignatelli B., Bancel B., Plummer M. et al. *Helicobacter pylori* eradication attenuates oxidative stress in human gastric mucosa // *Am. J. Gastroenterol.*— 2001.— Vol. 96.— P. 1758—1766.
  20. Uchida K. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress // *Prog. Lipid Res.*— 2003.— Vol. 42.— P. 318—343.
  21. Waeg G., Dimistry G., Esterbauer H. Monoclonal antibodies for detection of 4-hydroxynonenal modified proteins // *Free Radical Res.*— 1996.— Vol. 25.— P. 149—159.
  22. Zarkovic N. 4-Hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes // *Mol. Asp. Med.*— 2003.— Vol. 24.— P. 281—291.
  23. Zarkovic N., Zarkovic K., Schaur R.J. et al. 4-Hydroxynonenal as a second messenger of free radicals and growth modifying factor // *Life Sci.*— 1999.— Vol. 65.— P. 1901—1904.

**ПРОЯВЛЕНИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ЖЕЛУДКА БОЛЬНЫХ С ПЕПТИЧЕСКОЙ ЯЗВОЙ ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ ПОСЛЕ УСПЕШНОЙ ЭРАДИКАЦИИ HELICOBACTER PYLORI**

**А.П. Черкас, Х.О. Семен, О.П. Елисеева, Д.В. Каминский,  
М.М. Лазуренко, О.Я. Яцкевич, О.О. Абрагамович**

Проведено иммуногистохимическое исследование содержания и распределения вторичного продукта липопероксидации 4-гидрокси-2,3-транс-ноненаля (4-ГН) в слизистой оболочке желудка больных пептической язвой двенадцатиперстной кишки (ПЯДПК) и условно здоровых волонтеров. Показано более высокое накопление 4-ГН по сравнению с контрольной группой и особенно присутствие его в ядрах glanduloцитов у больных. После эрадикации *H. pylori* уровень накопления 4-ГН не уменьшался, в том числе и в ядрах glanduloцитов, что свидетельствует о персистенции окислительного стресса в слизистой оболочке желудка и требует использования эффективных средств коррекции окислительного метаболизма при комплексном лечении ПЯДПК.

**MANIFESTATIONS OF OXIDATIVE STRESS IN GASTRIC MUCOSA IN PATIENTS WITH DUODENAL PEPTIC ULCER AFTER SUCCESSFUL HELICOBACTER PYLORI ERADICATION**

**A.P. Cherkas, Kh.O. Semen, O.P. Yeliseyeva, D.V. Kaminsky,  
M.M. Lazurenko, O.Ya. Yatskevych, O.O. Abrahamovych**

The immunohistochemical evaluation of accumulation and distribution of 4-hydroxy-2,3-trans-nonenal (HNE) in gastric mucosa of *H. pylori*-positive duodenal peptic ulcer (DPU) patients and healthy volunteers was performed. Significantly higher HNE levels, especially in nuclei of glandular epithelium, in DPU patients comparing to healthy volunteers was shown. After successful eradication of *H. pylori* the levels of HNE didn't change significantly indicating persistence of oxidative stress in gastric mucosa. These findings suggest the importance of inclusion into the complex treatment of DPU remedies able to modulate oxidative stress manifestations.