

УДК 612.67+ 616.33-002.5

ПЕРСПЕКТИВЫ ТАРГЕТНОГО ПОДХОДА К ДИАГНОСТИКЕ И ТЕРАПИИ В ГЕРИАТРИИ

¹Полев В.А., ¹Крулевский В.А., ²Кветной И.М., ^{1,3}Горелик С.Г.

¹АНО «Научно-исследовательский медицинский центр «Геронтология»,
Москва, e-mail: sggorelik@mail.ru;

²Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН, Санкт-Петербург;

³ФГБОУ ДПО «Институт повышения квалификации ФМБА России», Москва

В статье представлены собственные исследования по выявлению особенностей изменений местного иммунитета при хроническом гастрите герпесвирусной этиологии, характеризующихся снижением содержания основных клеток иммунной защиты (CD-4, CD-8, CD-15, CD-16, CD-21, CD-56) и достоверным повышением уровня экспрессии антиапоптозной молекулы Bcl-2. Это показало необходимость внедрения этиотропной диагностики хронических гастритов в пожилом возрасте. Включение этиотропной диагностики хронического гастрита с применением методов этиологической диагностики, а также анализ местного иммунитета в диагностических программах, в перспективе позволит улучшить этиотропную и патогенетическую терапию с потенциальным включением противовирусных и иммуномодулирующих средств, а также качество диспансерного наблюдения. Таким образом, таргетный подход к диагностике и терапии в гериатрии является полезным и перспективным.

Ключевые слова: гастроэнтерология, хронический гастрит, таргетный подход, гериатрия, пожилой возраст, старческий возраст

PERSPECTIVES OF TARGET APPROACH TO DIAGNOSTICS AND THERAPY IN GERIATRICS

¹Polev V.A., ¹Kruevskij V.A., ²Kvetnoj I.M., ^{1,3}Gorelik S.G.

¹ANO «Research Medical Center, «Gerontology», Moscow e-mail: sggorelik@mail.ru;

²Institute of bioregulation and gerontology Russian Academy of Medical Sciences, St.Petersburg;

³Federal State Educational Institution of professional education «Institute for Advanced Studies of the Federal Medical and Biological Agency», Moscow

Our own researches on definition of the local immunity alterations characteristics in chronic gastritis of herpetic etiology, followed by reduction of basic immune defense cells (CD-4, CD-8, CD-15, CD-16, CD-21, CD-56) and firm increase of the antiapoptotic molecule Bcl-2 expression level are represented in the article. This showed the necessity of implementation of chronic gastritis etiotropic diagnostics in old ages. Inclusion of chronic gastritis etiotropic diagnostics followed by use of aetiologic diagnostics methods, as well as the analysis of local immunity in diagnostic programs, will let improve aetiopathogenetic diagnostics of chronic gastritis in old ages and consequently optimize their etiotropic and pathogenetic therapy with potential inclusion of antiviral and immunomodulatory elements, and make the quality of regular medical check-up too. To sum up, target approach to diagnostics and therapy in geriatrics is useful and perspective.

Keywords: gastroenterology, chronic gastritis, targeted approach, geriatrics, elderly, old age

В настоящее время не вызывает сомнения тот факт, что потребности комплексного лечения обуславливают необходимость точной этиологической диагностики заболеваний людей пожилого возраста и четкого достоверного понимания патогенетических сдвигов [1, 3, 4].

Одной из проблемных областей с точки зрения таргетности в гериатрии является гериатрическая гастроэнтерология в целом, и проблемы ведения пожилых людей с хроническим гастритом в частности. Это связано с тем, что довольно значительное количество пациентов в пожилом возрасте имеет сочетание инфицирования *Helicobacter pylori* (HP) и герпес-вирусами, однако клинико-морфологические особенности сочетанной инфекции изучены в малой степени [2, 5, 6, 7].

Цель работы – определить перспективы использования таргетного подхода к диа-

гностике и лечению в гериатрии (на примере ведения пожилых пациентов с хроническим гастритом).

Материалы и методы исследования

Мы провели обследование 200 лиц среднего возраста от 40 до 59 лет (мужчин – 132 чел., женщин – 68 чел., средний возраст 46,2 ± 3,3 года) и 180 пациентов пожилого возраста от 60 до 74 лет (мужчин – 116 чел., женщин – 64 чел., средний возраст 65,8 ± 2,8 года) страдающих хроническим гастритом, верифицированным морфологически. Проведенные пациентам исследования соответствуют этическим нормам Хельсинкской декларации (2000 г.) и Приказу Министерства здравоохранения РФ № 266 от 19.06.2003 г. На первом этапе рандомизация пациентов проходила в пределах клинической базы исследования, пациенты отбирались для исследования методом случайной выборки и стратифицировались по диагнозу «хронический гастрит» путем его установления эндоскопическим способом. В обследование не включались лица с хроническим гастритом (ХГ) на фоне язвенной болезни желудка

и двенадцатиперстной кишки и рака желудка, пациенты с воспалительными заболеваниями кишечника, целиакией, больные с хроническими заболеваниями дыхательной, сердечно-сосудистой и мочевыделительной систем в стадии декомпенсации. Для повышения достоверности дыхательных тестов исключались пациенты, имевшие хронические неспецифические заболевания легких и хроническую почечную недостаточность. На этом этапе проведен весь комплекс клинических исследований, а также инвазивная и неинвазивная диагностика хеликобактериоза.

Изучены биоптаты от пациентов с морфологически верифицированным хроническим гастритом. Проведено серологическое исследование на герпес-вирусы у пациентов с позитивной иммуногистохимической (ИГХ) реакцией на герпес-вирусы.

Серологическая диагностика герпес-инфекции проводилась следующим образом. Антитела IgG-ЕА-ЕВV и IgM-NA-ЕВN определялись методом ИФА с помощью стандартных наборов фирмы «Вектор Бест». Расчет проводился по уровню негативного контроля, который с расчетом серой зоны составил для антител класса IgG в экстинциях-0,452, а для антител класса IgM-в экстинциях-0,502. Величины выше этих показателей свидетельствовали о наличии антител.

Антитела к герпесу 1 и 2 типов и цитомегаловирусу определялись специальной оригинальной модифицированной реакцией связывания комплемента (РСК), совмещающей в себе реакцию связывания компонентов с ферментным тестированием реакции на конечном этапе [О.А. Аксенов и соавт. патент № 2034025].

Электронно-микроскопическое исследование биоптатов слизистой оболочки желудка. Для электронно-микроскопического исследования биоптаты тела и антрального отдела желудка фиксировали в 2,5% глутаральдегиде с последующей дофиксацией 1% раствором четырехоксида осмия и заливали в аралдит-М. Ультратонкие срезы получали в ультратоме LKB-3 и изучали в электронном микроскопе JEM-100S (JEOL).

Иммуногистохимические исследования биоптатов слизистой оболочки желудка и 12-перстной кишки. Для проведения иммуногистохимических реакций из парафиновых блоков готовились срезы толщиной 3 мкм, переносились на предметные стекла, покрытые L-полилизинном (Sigma). Для проведения иммуногистохимической реакции использовали стандартный протокол.

Для выявления вирусных антигенов в качестве первых антител использовали поликлональные антитела к вирусам простого герпеса 1 и 2 типов (DAKO), моноклональные антитела к раннему антигену цитомегаловируса и моноклональные антитела к латентному мембранному протеину ВЭБ (Novocastra). Для оценки апоптоза и пролиферации в качестве первичных специфических антител использовали моноклональные антитела (Novocastra – RTU-p53-DO7, RTU-bcl-2, RTU-Ki-67-MM1, 1:25-СРР32 JHM62), а для оценки цитокинового статуса – моноклональные антитела к CD-4, CD-8, CD-15, CD-16, CD-21, CD-56 (все Novocastra, 1:100). В качестве вторичных антител и визуализирующей системы применяли Novostain Universal Detection Kit («Novocastra», NCL-RTU-D). Докраску ядер осуществляли гематоксилином.

Экспрессию вирусных антигенов в слизистой оболочке оценивали по наличию светло- и темно-коричневых гранул в структурах слизистой оболочки желудка при микроскопическом исследовании в обычном световом микроскопе. Применялась полу-

количественная шкала оценки интенсивности (0 – отсутствие, 1 – слабая, 2 – умеренная, 3 – выраженная). При этом поле зрения считалось пригодным для данной оценки признака при наличии в нем не менее 60% позитивно окрашенных клеток. Исследования проводили с положительным и отрицательным контролем. Оценка апоптоза и цитокинового статуса проводилась с помощью системы компьютерного анализа микроскопических изображений (Nikon). Морфологические изображения, поступающие через оптическую систему микроскопа Nikon Eclipse 400 (увеличение $\times 320$: объектив 40, окуляр 10, фильтр 0,8) регистрировались цифровой цветной видеокамерой Nikon DXM1200, вмонтированной в тубус микроскопа и передавались в компьютер Pentium-4.

Статистическая обработка результатов исследования. Полученные в ходе работы данные регистрировались в специально разработанной таблице, включающей паспортную часть, анамнез заболевания и сопутствующие болезни, клиническое течение заболевания, данные объективного и лабораторно-инструментальных методов обследования, а также показатели специальных методов обследования. Массив исходных данных был подготовлен так, что можно было сравнивать весь имеющийся набор сведений в анализируемых группах и подгруппах разного уровня.

Статистическая обработка материалов исследования осуществлялась на персональном компьютере IBM PC (Intel Pentium-III), Windows Millennium с помощью программных средств и пакета Statistica for Windows Version 6.0 (StatSoft Inc., США). Для оценки гипотезы нормальности распределения имеющихся выборок данных использовали критерий Колмогорова-Смирнова. При соответствии нормальному закону распределения признака проверку гипотезы о равенстве средних выборочных величин проводили с использованием t-критерия Стьюдента с оценкой достоверности различий ($p < 0,05$) по значениям $M \pm m$. Для оценки достоверности различий независимых выборок, не подчиняющихся критерию нормального распределения, применяли непараметрический критерий Манна-Уитни, для зависимых выборок данных использовали критерий Вилкоксона. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Для сравнения средних показателей количественных признаков в исследуемых группах использовался t-критерий Стьюдента с оценкой достоверности различий ($p < 0,05$) по значениям $M \pm m$. При оценке связей качественных показателей применяли критерий достоверности связи ($p < 0,05$) с χ^2 Пирсона, χ^2 с поправкой Йетса, критерий Фишера. Для выявления статистических связей между признаками в ряде случаев использовали корреляционный анализ. Измерение корреляционной зависимости осуществляли с использованием ранговой корреляции по Пирсону и Спирмену. Различия и корреляции считали достоверными при $p < 0,05$. Для решения задачи классификации признаков по качественному (группирующему) показателю, а также для ранжирования признаков по степени влияния на этот показатель использовался линейный пошаговый дискриминантный анализ с использованием стандартного пакета программы SPSS (14 версия). Включение признаков в дискриминантные уравнения и их ранжирование основывалось на величине F-критерия Фишера. Отнесение наблюдения к той или иной группе осуществлялось путем вычисления дискриминантных сумм для каждой из групп и определения максимальной суммы.

**Результаты исследования
и их обсуждение**

***Возрастные отличия в состоянии
клеточного иммунитета при хрониче-
ском герпес-вирусном гастрите.***

Известно, что при нарушениях иммунно-го статуса герпетическая инфекция развивается чаще и характеризуется более тяжелым течением, что связано с недостаточностью иммунитета или избыточной иммунной реакцией. Механизмы иммунопатологии при хроническом гастрите, вызванном герпетической инфекцией, разнообразны и включают как ответ на персистирующий антиген, так и неадекватную регуляцию вирусспецифического иммунного ответа.

Изучение местного иммунитета при хроническом гастрите показало, что у пациентов пожилого и среднего возраста наблюдается снижение количества CD4-клеток, и увеличение количества CD8-клеток по сравнению со здоровыми людьми ($p < 0,05$).

Так, у пациентов пожилого возраста количество CD3-клеток составило $37,6 \pm 0,5\%$, у лиц среднего возраста этот показатель был равен $55,6 \pm 1,9\%$ ($p < 0,05$). Отмечалась достоверная разница в содержании CD4-клеток у пожилых пациентов – $17,9 \pm 0,2\%$; у лиц среднего возраста их количество составило $35,3 \pm 2,7\%$ ($p < 0,05$). При исследовании количества CD8-клеток показатели у пожилых пациентов были $26,3 \pm 0,6\%$, у лиц среднего возраста – $28,3 \pm 0,9\%$. Повышение показателя по сравнению со здоровыми было связано с затяжным течением заболевания или

осложнениями.

Одновременно с этим отмечено снижение CD-56, CD-16, CD-15, CD-21 иммуноположительных клеток в обеих возрастных группах по сравнению с контрольной группой.

Так, содержание CD-56 клеток в основной группе было $25,8 \pm 1,2\%$; в контрольной группе – $34,5 \pm 0,6\%$. Содержание CD-16 клеток у пациентов основной группы составило $11,3 \pm 0,6\%$; у лиц среднего возраста – $13,4 \pm 0,3\%$ ($p < 0,05$).

Определение CD-15 клеток выявило следующие показатели: в основной группе – $11,0 \pm 0,3\%$; в контрольной группе – $12,0 \pm 0,24\%$ ($p < 0,05$). При этом содержание CD-21 клеток в основной и контрольной группе также выявило достоверную разницу: $14,2 \pm 0,5$ и $15,9 \pm 0,06\%$ соответственно ($p < 0,05$).

Различия в иммунологических показателях у больных зависели от возраста пациентов. Установлено достоверное ($p < 0,05$) уменьшение количества данных показателей в группах пациентов пожилого возраста по сравнению с лицами среднего возраста (табл. 1).

Таким образом, отмечается достоверное снижение клеточного иммунитета при герпетическом инфицировании и развитии хронического гастрита у лиц пожилого возраста по сравнению с лицами среднего возраста ($p < 0,05$).

Выраженность иммунопатологического компонента в данном случае, по-видимому, можно снизить путем воздействия на отдельные звенья иммунной системы.

Таблица 1

Показатели местного иммунитета у больных разных возрастов при хроническом герпесвирусном гастрите

Показатели иммунитета, % клеток	Основная группа (n = 200)	Контрольная группа (n = 96)	Здоровые лица (n = 120)
CD-3	$37,6^{\wedge} \pm 0,5$	$55,6^{\wedge} \pm 1,9^*$	$62,25^{\wedge} \pm 0,12^{**}$
CD-4	$17,9^{\wedge} \pm 0,2$	$35,3^{\wedge} \pm 2,7^*$	$34,75^{\wedge} \pm 0,16^{**}$
CD-8	$26,3^{\wedge} \pm 0,6$	$28,3^{\wedge} \pm 0,9^*$	$25,0^{\wedge} \pm 0,14^{**}$
CD-56	$25,8^{\wedge} \pm 1,2$	$34,5^{\wedge} \pm 0,6^*$	$36,0^{\wedge} \pm 0,11^{**}$
CD-16	$11,3^{\wedge} \pm 0,6$	$13,4^{\wedge} \pm 0,3^*$	$14,75^{\wedge} \pm 0,14^{**}$
CD-15	$11,0^{\wedge} \pm 0,3$	$12,0^{\wedge} \pm 0,24^*$	$14,75^{\wedge} \pm 0,14^{**}$
CD-21	$14,2^{\wedge} \pm 0,5$	$15,9^{\wedge} \pm 0,06^*$	$20,0^{\wedge} \pm 0,21^{**}$

Примечание:

* ($p < 0,05$) – достоверность различий между показателями иммунитета в разных возрастных группах;

** ($p < 0,01$) – достоверность различий средних показателей у больных и здоровых.

Влияние инфицированности герпетическими вирусами на апоптоз в слизистой оболочке желудка.

Было изучено состояние клеточного гомеостаза у лиц с хроническим гастри-

том при инфицировании герпесвирусами. Сравнительный анализ проводился между практически здоровыми пациентами, у которых при фиброгастродуоденоскопии (ФГДС) и морфологическом исследовании

биоптатов, взятых из антрального и фундального отделов желудка, не обнаруживалось никаких воспалительных или атрофических изменений. При иммуногистохимическом исследовании эпителиоциты слизистой оболочки желудка показали низкую пролиферативную активность, определяемую по экспрессии маркера Ki-67 (количество иммунопозитивных по Ki-67 клеток = $1,46 \pm 0,01$) и индексу апоптоза ($I_{\text{АПТ}} = 0,33 \pm 0,01$ %). Наряду с этим наблюдалась очень низкая экспрессия антиапоптотического маркера (количество иммунопозитивных по Vcl-2 клеток = $0,93 \pm 0,26$ %).

У больных с хроническим гастритом при ФГДС определялся антральный гастрит. При морфологическом исследовании обнаруживались признаки активного воспаления, присущего герпес-вирусному гастриту.

Изучаемые показатели клеточного гомеостаза при хроническом гастрите характеризовались увеличением пролиферативной активности, выраженной через увеличение числа клеток, иммунопозитивных к Ki-67, до $12,70 \pm 0,29$ на 1 мм^2 слизистой оболочки желудка и повышение $I_{\text{АПТ}}$ до $0,55 \pm 0,02$ % при умеренном возрастании экспрессии Vcl-2 (количество Vcl-2 иммунопозитивных клеток = $1,95 \pm 0,12$). У пациентов с хроническим гастритом при ФГДС выявлялась мультифокальная атрофия слизистой оболочки антрального отдела желудка.

При морфологическом исследовании на большом протяжении слизистой оболочки отмечалась ее гипертрофия с участками атрофии. В эпителиоцитах регистрировались дистрофические изменения различной степени выраженности. Возрастала численность слизеобразующих клеток. Границы между эпителиальными клетками плохо контурировались.

Помимо атрофии слизистой оболочки желудка наблюдались ее воспалительные изменения. При этом определялись отечность собственного слоя слизистой оболочки желудка, его инфильтрация лимфоцитами и плазматическими клетками. Исследуемые показатели клеточного гомеостаза характеризовались значительным преобладанием пролиферативной активности эпителиоцитов слизистой оболочки антрального отдела желудка (количество Ki-67 иммунопозитивных клеток = $68,70 \pm 1,38$) над их апоптотическим потенциалом ($I_{\text{АПТ}} = 0,54 \pm 0,02$) при высокой экспрессии Vcl-2 (количество Vcl-2 иммунопозитивных клеток = $17,52 \pm 0,98$).

При исследовании процессов клеточного обновления (Ki-67, Vcl-2, $I_{\text{АПТ}}$)

определены следующие показатели. Для Ki-67 – $56,30 \pm 0,99$ клеток на 1 мм^2 слизистой оболочки желудка, для Vcl-2 – $7,75 \pm 0,20$ клеток и для $I_{\text{АПТ}}$ значение $1,92 \pm 0,04$ %, свидетельствующие о значительном возрастании пролиферативного потенциала эпителиоцитов слизистой оболочки желудка при умеренном увеличении $I_{\text{АПТ}}$.

Таким образом, данные изменения клеточного обновления слизистой оболочки желудка обусловлены повышением уровня экспрессии антиапоптотической молекулы Vcl-2.

Заключение

В ходе исследования выявлены особенности изменений местного иммунитета при хроническом гастрите герпесвирусной этиологии. Эти изменения характеризуются снижением содержания основных клеток иммунной защиты (CD-4, CD-8, CD-15, CD-16, CD-21, CD-56) и достоверным повышением уровня экспрессии антиапоптотической молекулы Vcl-2. Исходя из этого, таргетный подход к диагностике в гериатрии диктует необходимость этиотропной диагностики хронических гастритов в пожилом возрасте. Включение этиотропной диагностики хронического гастрита с применением методов этиологической диагностики, а также анализ местного иммунитета в диагностических программах в перспективе позволит улучшить этиопатогенетическую диагностику хронических гастритов в пожилом возрасте и соответственно оптимизировать их этиотропную и патогенетическую терапию с потенциальным включением антивирусных и иммуномодулирующих средств, а также качество диспансерного наблюдения. Таким образом, таргетный подход к диагностике и терапии в гериатрии является полезным и перспективным.

Список литературы

1. Голофеевский В.Ю. Хронический гастрит: важнейшие вопросы клинической и морфологической диагностики / В.Ю. Голофеевский, А.Б. Смолянинов // Рос. мед. журнал «Aqua Vitae». – 2001. – №1. – С.16–18.
2. Крулевский В.А. Возрастные различия в цитокиновом статусе при хроническом герпес-ассоциированном гастрите / Крулевский В.А. // Врач. – 2014. – № 6 (вып. Геронтология и гериатрия). – С. 96–98.
3. Прошаев К.И., Ильницкий А.Н., Зезюлин П.Н., Филиппов С.В., Лукьянов А.А., Жернакова Н.И. Медико-социальные проблемы геронтологии и гериатрии: осведомленность населения и медицинских работников // Успехи геронтологии. – 2008. – Т. 21, № 1. – С. 160-164.
4. Рапорт С.И., Жернакова Н.И., Прошаев К.И., Кветной И.М., Рыбникова С.Н., Постникова Л.И. Язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки: морфофунк-

циональные, нейроэндокринные и клинические параллели // Клиническая медицина. – 2008. – С. 28–30.

5. Fang C.Y., Chiang C.Y., Pan Y.R., Tse K.P., Chang Y.S., Chang H.Y. «Modulation of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 activity by intrabodies». – *Intervirology*. – 2007. – P. 254–263.

6. Kazmirchuk V.E., Miroshnikova M.I. Treatment of complicated Epstein-Barr viral infections // *Modern infections*. – 2002. – Vol.4 – P. 12–19.

7. Shibata D, Weiss L.M. Epstein-Barr virus associated gastric carcinoma. *Am J Pathol.* – 1992. Vol.140. – P. 769–774.

References

1. Golofeevskij V.Ju. Hronicheskiy gastrit: vazhnejshie voprosy klinicheskoy i morfologicheskoy diagnostiki /V.Ju. Golofeevskij, A.B. Smoljaninov // *Ros. med. zhurnal «Aqua Vitae»*. 2001. no. 1. pp. 16–18.

2. Krulevskij, V.A. Vozrastnye razlichija v citokinovom statuse pri hronicheskom herpes-associirovannom gastrite / Krulevskij V.A. // *Vrach*. 2014. no. 6 (вып. Gerontologija i geriatrija). pp. 96–98.

3. Proshhaev K.I., Il'nickij A.N., Zezjulin P.N., Filippov S.V., Luk'janov A.A., Zhernakova N.I. Mediko-social'nye problemy gerontologii i geriatrii: osvedomlennost'

naselenija i medicinskih rabotnikov // *Uspehi gerontologii*. 2008. Vol. 21, no. 1. pp. 160–164.

4. Rapoport S.I., Zhernakova N.I., Proshhaev K.I., Kvetnoj I.M., Rybnikova S.N., Postnikova L.I. Jazvennaja bolezn' zheludka i dvenadcatiperstnoj kishki: morfofunkcional'nye, nejroendokrinnye i klinicheskie paralleli // *Klinicheskaja medicina*. 2008. pp. 28–30.

5. Fang C.Y., Chiang C.Y., Pan Y.R., Tse K.P., Chang Y.S., Chang H.Y. «Modulation of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 activity by intrabodies». – *Intervirology*. 2007. pp. 254–263.

6. Kazmirchuk V.E., Miroshnikova M.I. Treatment of complicated Epstein-Barr viral infections // *Modern infections*. 2002. Vol. 4. pp. 12–19.

7. Shibata D, Weiss LM. Epstein-Barr virus associated gastric carcinoma. *Am J Pathol*. 1992. Vol.140. pp. 769–774.

Рецензенты:

Осипова О.А., д.м.н., кафедра госпитальной терапии НИУ «БелГУ», г. Белгород;
Прощаев К.И., д.м.н., профессор, директор АНО «НИМЦ «Геронтология», г. Москва.

Работа поступила в редакцию 14.08.2014.