

НОВОСТИ

1999, т.1, №2
ноябрь

биологии и медицины

- Бюллетень Научно-информационного центра
медицинского факультета СумГУ и ЧП "Ангио"



Возбудитель язвенной болезни под прицелом ученых

- Олег Смирнов, к.б.н., ст.н.сотр.

Язвенная болезнь чаще поражает людей в 30-40 лет, а мужчин в 6 раз чаще, чем женщин. Всегда считалось, что в этом виноваты курение и алкоголь, стрессы (провоцирующие выработку кислоты), нерациональное питание, запущенный гастрит. Существует и наследственная предрасположенность к этой болезни.

Но в 1982 г. австралийский ученый Барри Маршалл открыл, что язвенная болезнь желудка имеет инфекционную природу – ее вызывает бактерия *Helicobacter pylori*: Она была выделена из образца эпителия желудка пациента, страдавшего обострением хронического гастрита. В пользу открытия д-ра Маршалла свидетельствуют следующие факты. Микроб обнаружен у 100% больных язвой двенадцатиперстной кишки и у 80-90% – с язвой желудка. После антимикробной терапии без обычного противоязвенного лечения рецидивы наблюдались в 5% случаев, а после противоязвенной терапии без применения антибиотиков – в 70%. В исследованиях на добровольцах, вводя им бактерии, Маршалл воспроизвел гастрит (1986 г.). Эта новая точка зрения на



Биология:

Биологическое оружие: новые "перспективы"? 6



Медицина:

Возбудитель язвенной болезни под прицелом ученых 1

Курение, сердце и кровообращение 10



Книжная полка: 4



Газетный дайджест: 14



Новости: 3, 11-13, 14-15

язву ранее с насмешками отвергались многими врачами, а теперь данное открытие расценивается как одно из величайших медицинских достижений конца XX века.

H. pylori – грамтрицательная спиралевидная бактерия с 4–6 завитыми жгутиками на одном полюсе клетки, способная выживать в кислотной среде (бактериальный фермент уреазы превращает мочевину в аммиак и бикарбонат, которые также повреждают слизистую оболочку желудка и двенадцатиперстной кишки). С помощью жгутика она прикрепляется к стенке желудка, продырявливает слизистую, на которую действует желудочный сок. В итоге бактерия вызывает гастрит В-типа, язву, острый и хронический гастроэнтерит, приводит к атрофическому гастриту (и падению уровня пепсиногена I), может также вызывать рак желудка. Полагают, что *H. pylori* имеет отношение и к аденокарциноме. Поэтому определение бактерии имеет чрезвычайное значение в диагностике болезней желудка.

Исследования д-ра Грехема (г. Хьюстон) показали, что *Helicobacter* поражает только человека, распространен в основном в развивающихся странах, вызывает язву не у всех инфицированных, как и в случае туберкулеза. Во многих районах Индии заражено 100% населения. В США микроб был обнаружен среди 30% взрослых, причем у 10% лиц среднего возраста и 50–60% людей старше 60–65 лет, то есть инфицированность людей за последние годы снизилась (по-видимому, за счет широкого применения антибиотиков), а рак желудка переместился на 6-е место. И вот теперь, когда сомнения развеяны: *Helicobacter* ответственен за наиболее распространенную хроническую бактериальную инфекцию человека, можно применять такие способы лечения, как интенсивную противобактериальную терапию и вакцинацию. Западные врачи говорят о возможной перспективе ликвидации язвы.

Наконец, совсем недавно американские ученые совершили новое блестящее техническое достижение: полностью расшифровали структуру генома *Helicobacter pylori*. Д-р Жан-Франсуа Томб и его коллеги из Института исследования генома (Роквилл, штат Мэриленд, США) выяснили, что кольцевая хромосома бактерии состоит из 1667867 пар нуклеотидов, что должно соответствовать 1590 генам (данные опубликованы в журнале *Nature* в августе 1997 г.). Анализ ДНК показал, что *H. pylori* имеет хорошо развитые системы, обеспечивающие подвижность клетки, утилизацию железа (необходимого для выживания), рестрикцию и модификацию (механизмы защиты против вторжения чужеродной ДНК). Были идентифицированы многие предполагаемые адгезины (обеспечивающие прилипание клетки) и белки наружной мембраны, что подчеркивает сложность взаимодействия бактерии и слизистой оболочки желудка. Подобно другим болезнетворным организмам, *H. pylori* использует особые механизмы для того, чтобы избежать иммунного ответа хозяина и адаптироваться к изменениям в окружающей среде (среде желудка).

Сравнивая гены бактерии с компьютерной базой данных (генами других организмов с уже известными функциями), группа д-ра Томба расшифровала роль многих из этих генов. Ученые обнаружили, например, гены, отвечающие за построение мощного отростка – жгутика, позволяющего бактерии поворачиваться вокруг себя, гены, помогающие ей приклеиваться к клеткам, а также генетический механизм, непрерывно изменяющий структуру оболочки, что позволяет

отразить атаку иммунной системы. Полученная информация будет весьма полезна при разработке лекарств и вакцин против возбудителя.

Расшифровка бактериального генома пока не является рутинной процедурой. Геном *Helicobacter* – всего лишь пятый бактериальный геном, который полностью определен и опубликован к осени 1997 г. Он был выбран в силу важности этого возбудителя, его уникальных биологических свойств, а также ценности информации. Американский Институт исследования генома сам оплатил полную стоимость проекта и распространил результаты работы для бесплатного использования (помимо журнала *Nature*, они имеются в Интернете для всех желающих по адресу <http://www.tigr.org/tdb/mbd/hpdb/hpdb.html>).

Исследователи утверждают, что существует громадное разнообразие (гетерогенность) штаммов *H. pylori*, и это может объяснить, почему некоторые люди не поражаются, в отличие от других. Одни могут иметь возбудителя годами, и без всяких симптомов, тогда как у других развиваются язвы и другие болезни желудка, включая рак желудка – весьма распространенное злокачественное заболевание в большей части Восточной Европы, Латинской Америки и Азии. Оказывается, риск образования язвы связан со штаммами, несущими гены, кодирующие факторы вирулентности – *CagA* (связанный с цитотоксичностью) и *VacA* (цитотоксический вакуолизирующий белок). Высокомолекулярный антиген *CagA* вызывает специфический иммунный ответ и обнаружен у 100% инфицированных пациентов с язвой желудка, и только у 60% инфицированных пациентов с гастритом. Следовательно, наличие антигена свидетельствует о повышенном риске развития рака желудка. Гены можно выявить классическими методами (с помощью ЦПР – цепной полимеразной реакции; вестерн-блоттинг – гибридизации белков), но они не подходят для массовых анализов.

(Окончание в следующем номере)



- Вновь в августе 1999 г. от укусов пчел-убийц пострадали люди – жители США. В 50-х гг. в Южную Америку из Африки завезли пчел, которые скрестились с местными видами; полученный гибрид быстро распространился по странам Латинской Америки и добрался даже до Техаса, Флориды и Калифорнии.

- В Канзасе (США) из школьных программ 1999 г. исключена дарвиновская теория эволюции, что свидетельствует о победе в этом штате религиозного мракобесия. В штате Теннесси в 1925 г. уже была запрещена теория эволюции Дарвина, и судили учителя, осмелившегося рассказать о ней школьникам. С легкой руки журналистов судебное расследование получило название "обезьяний процесс". Присяжные признали вину подсудимого, учителя уволили. Сейчас около 50% американцев верят в божественное происхождение человека. По-видимому, теперь на очереди будет астрономия. Один ученый по этому поводу высказался так: "Наука противоречит вере, но нельзя, чтобы вера вытесняла науку".

- В Челябинске начали добавлять в хлеб витаминно-минеральную добавку фортамин, в состав которой входят железо и фолиевая кислота. Такой хлеб активизирует обмен веществ и полезен беременным женщинам и детям.

НОВОСТИ

1999, т. 1, №3

декабрь

биологии и медицины

● Бюллетень Научно-информационного центра
 медицинского факультета СумГУ и ЧП "Ангио"



Витамин С, эволюция человека и атеросклероз

● *Александр Атаман, д.м.н., проф.*

Хорошо известно, что организм человека не способен синтезировать необходимую для процессов жизнедеятельности аскорбиновую кислоту (витамин С). Среди млекопитающих существуют только четыре вида, не обладающих способностью продуцировать витамин С. Это; 1) человек; 2) гориллы; 3) морские свинки и 4) крыланы – вид летучей мыши, обитающий в тропических странах и питающийся плодами растений. Все перечисленные виды, кроме человека, по своей природе являются "вегетарианцами". Поэтому для них не существует проблемы витамина С: они инстинктивно потребляют его столько, сколько необходимо, чтобы оставаться здоровыми.

В организме продуцирующего витамин С млекопитающих аскорбиновая кислота образуется из глюкозы в результате небольших модификаций ее молекулы. Для этого необходимы всего лишь четыре фермента. У человека есть первые три из четырех, а вот последний – четвертый – отсутствует. Он, как считают, был безвоз-



Медицина:

Витамин С, эволюция человека и атеросклероз 1
 Возбудитель язвенной болезни под прицелом ученых (окончание) 6



Экология: 10



Технология: 11



История науки:

Нобелевские лауреаты 12



Газетный дайджест: 14



Календарь событий: 15



Новости: 5, 9, 14



Возбудитель язвенной болезни под прицелом ученых

● Олег Смирнов, к.б.н., ст.н.собр.

(Окончание. Начало в предыдущем номере)

Существуют три основные группы методов диагностики хеликобактериоза.

1. Методы, основанные на анализе образцов, полученных с помощью биопсии в процессе эндоскопии. Это и культивирование – типичный метод классической микробиологии, и анализ биоптатов на уреазную активность, и гистологическое исследование, и исследование взятого материала методами ДНК-анализа (ЦПР) или иммуноблоттинга. Их общие недостатки: 1) инвазивность (биопсия); 2) взятый образец может не отражать состояние всей стенки желудка (разные образцы от одного пациента дают различные результаты), т.е. не будет репрезентативным.

2. Иммунологические методы, позволяющие обнаружить антитела против возбудителя. Их недостаток – не позволяют отличать текущую инфекцию от прошедшей. Но зато благодаря своей простоте они находят широкое применение. Специфичность этих методов зависит от качества используемого антигена и качества цветоразрешения.

Наличие в сыворотке специфических антител против *Helicobacter pylori* имеет диагностическое значение. Присутствие антител в концентрации свыше 28 Ед/мл характерно для язвы желудка и двенадцатиперстной кишки во всех возрастных группах, причем у лиц старше 50 лет концентрация уже свыше 9 Ед/мл свидетельствует о наличии язвы. Вне зависимости от возраста концентрация менее 9 Ед/мл не может указывать на наличие язв. Реакции выполняются в планшетах для иммунологических реакций.

Тест-наборы выпускают многие фирмы: для определения в сыворотке антител – Cambridge Life Science (Великобритания), продолжительность анализа 90 мин; для определения в сыворотке IgG- и IgA-антител – DIESSE (Италия), INOVA Diagnostics (США) и другие. Быстрый метод обнаружения антител в 25 мл крови в течение нескольких минут разработала и фирма Orion Diagnostica (Финляндия).

Тест-система фирмы Teco Diagnostics (США) основана на быстром одностадийном методе, определяющем антитела классов IgG, IgM и IgA. Сыворотка движется по поглощающей жидкости бумажной полоске, и если в ней имеются антитела, то они связываются с нанесенной на бумагу полоской антигена, к которому присоединен краситель. Образовался комплекс антитело–антиген–краситель – появилась цветная полоса. Время анализа 10 мин. Fisher Scientific (SEA) PTE (Сингапур) разработала быстрый тест на все классы антител к *H. pylori*. Краситель (коллоидное золото) с помощью особых иммунологических реакций присоединяется к человеческим иммуноглобулинам, находящимся в исследуемом образце, и если там присутствуют какие-либо антитела к возбудителю, этот сложный комплекс в ходе хроматографии присоединяется к антигену *H. pylori*, прикрепленному к твердому носителю (подложке). В результате появляется розово-красная линия. Контрольный (положительный) образец позволяет проверить правильность выполнения теста. Анализ 390 образцов показал, что чувствительность

метода составила 90%, а специфичность – 96%. Фирма Saliva Diagnostic Systems (Великобритания) выпускает тест-систему, анализирующую всего 3 мкл крови из пальца. Капиллярным накопником пробирки, содержащей тест-полоску, прикасаются к капле крови, затем погружают его в колпачок с буферным раствором. В течение 15 мин происходит иммунохроматография. При наличии антител к *H. pylori* появляется красная полоска. Исследования 120 образцов выявили 100%-ную специфичность и 98%-ную чувствительность. Совпадение с данными биопсии составило 99%.

Диагностический метод характеризуется тремя показателями.

Специфичность метода равняется 100% минус процент ложноположительных ответов среди заведомо отрицательных проб.

Чувствительность метода равняется 100% минус процент ложноотрицательных ответов среди заведомо положительных проб.

Точность метода – это доля правильных положительных и правильных отрицательных ответов от общего числа анализов.

Австралийская Amrad Biotech использует технологию ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay – твердофазный иммуноферментный анализ), основанную на взаимодействии меченых биотином антигенов и стрептавидина, связанного с пероксидазой; результаты готовы через 1,5 ч. Инактивированные природные антигены иммобилизованы (прикреплены) на твердую подложку. В сравнении с культуральным тестом чувствительность метода 96%, специфичность 86%. Фирма Biomerica Inc. (США) производит три теста для обнаружения IgG, IgM и IgA (результат готов через 2 ч), а также универсальный тест для обнаружения IgG-антител в крови и сыворотке в течение 1 мин.

Тест-системы фирмы Radim SpA (Италия) позволяют обнаружить IgG-антитела к белку CagA. Белок, полученный генно-инженерным методом и не содержащий других бактериальных белков, прикреплен к твердой фазе. Тест на CagA выпускает и Biomerica Inc. (США). Германская фирма R-Biopharm GmbH продает систему для определения антител в сыворотке к обоим факторам вирулентности – CagA и VacA.

Обычно концентрация IgG в слюне – менее 1% уровня антител в сыворотке, поэтому достаточно чувствительный тест в принципе может использоваться для выявления антител в слюне, т.е. можно избежать взятия образца крови. Фирма Ani Biotech Oy (Финляндия) разработала быстрый метод обнаружения антител в слюне. Одностадийная иммунохроматографическая процедура может выполняться дома самим пациентом. Слюна отбирается палочкой с ватным тампоном (условие – не пить за 2 ч до взятия пробы, чтобы не изменился состав слюны), тампон переносится в специальную пробирку, и слюна диффундирует в реакционную жидкость, содержащую буфер для компенсации отклонений в pH слюны. По изменению цвета делается соответствующий вывод. Специфичность метода 95%, чувствительность 98,2%, точность – 96,3%.

3. Метод "мочевина + дыхание" (urea breath test, UBT) – весьма чувствительный, определяет наличие возбудителя именно в данный момент, и потому наиболее подходит для мониторинговой терапии. Он основан на определении уреазной активности. Больной проглатывает ^{13}C -меченую мочевину ($\text{H}_2\text{N}^{13}\text{CONH}_2$), которая усваивается бактерией благодаря ферменту уреазе. Образовавшийся меченый углекислый газ поступает в кровь и затем выделяется при дыхании. Если отбирать каждые 10 мин пробы выдыхаемого воздуха и оценивать соотношение $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$, можно обнаружить, что рост кривой начинается через 10 мин, пик $^{13}\text{CO}_2$ достигается через 30 мин, а

падение происходит через 60. В анализируемой пробе воздуха молекулы CO_2 автоматически отделяются от N_2 и O_2 , затем ионизируются и ускоряются, поступая в анализатор. В магнитном поле траектории молекул с разным молекулярным весом различаются, позволяя провести анализ соотношения изотопов. Недостаток метода состоит в том, что требуется наличие соответствующего прибора – масс-спектрометра, определяющего соотношение изотопов. Цена этих приборов такова, что они имеются главным образом в центральных учреждениях, а, следовательно, образцы для анализа нужно транспортировать, пациент же должен ждать результата. Специальную мочевины выпускает фирма Campro Scientific (Нидерланды), а тест-систему – INFAL GmbH (Германия). Десять мл воздуха отбираются перед приемом мочевины, затем 10 мл спустя 30 мин, и обе пробы анализируются в течение 2 мин. По разным данным, специфичность метода 98–98,5%, чувствительность 97,9–100%, что сравнимо с традиционными инвазивными методами эндоскопии.

Масс-спектрометр BreathMat выпускает немецкая фирма Finnigan MAT GmbH, одновременно анализируются 200 проб. Спектрометр на 160 образцов (время анализа 2 мин) выпускает фирма Meridian (Южная Корея). Analytical Development (Великобритания) производит небольшой настольный анализатор Pyloritest, выдающий результаты через 1 мин. Американская Alimenterics Inc. производит лазерный анализатор, использующий спектроскопию с так называемым оптогальваническим лазерным эффектом ("опто" – сокращение от "оптический"). За час анализируются образцы от 20 пациентов (по 3 пробы от каждого).

Если Вас заинтересовала продукция упомянутых фирм, обращайтесь в Научно-информационный центр "Ангио".

Вообще методы анализа выдыхаемого воздуха позволяют обнаружить усиленный рост бактерий, опорожнение желудка, толерантность к глюкозе (ее переносимость), непереносимость лактозы, дисфункции печени и нарушения деятельности поджелудочной железы.

Наконец, недавно появился новый, 4-й оригинальный метод диагностики: итальянская фирма Meridian Diagnostics разработала тест-систему для иммунологического обнаружения антигенов *Helicobacter pylori* в свежих или замороженных образцах кала. Метод позволяет подтвердить наличие инфекции при отсутствии ложноположительных результатов, встречающихся при анализе сыроворотки пациентов, которые имели заболевание в прошлом. Метод хорошо коррелирует с УВТ и инвазивными методами. Результат готов через 75 мин.

Современное лечение основано на применении солей висмута (препарат Де-Нол) в сочетании с метронидазолом и антибиотиками (ампициллин, эритромицин). Впрочем, из-за высокой стоимости, появления лекарственной устойчивости, недостаточной податливости бактерии, а также высокой скорости реинфекции (повторного заражения) эта терапия, по мнению западных врачей, не обеспечивает излечения на длительный период, что особенно актуально для бедных людей в развивающихся странах.

Полагают, что способ передачи инфекции – фекально-оральный и орально-оральный (при поцелуях), а также через свежезагрязненную пищу и воду. Бактерию могут переносить комнатные мухи, на лапках и в кишечнике которых она выживает в течение суток. Следовательно, надо мыть руки и уничтожать мух. Введение закрытых канализаций резко сокращает заболеваемость.

Если же бактерия попала в организм, стрессы, курение и неправильное питание, повредив стенку желудка, смогут спровоцировать вспышку болезни.