

УДК 579.835.12:616.361.361

РОЛЬ БАКТЕРИЙ РОДА *HELICOBACTER* ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ПЕЧЕНИ И ЖЕЛЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЕЙ (литературный обзор)

А.В. Цыркунов, В.В. Тарасов, С.Э. Савицкий

ГУ «1134 Военный госпиталь ВС РФ»

УЗ «Гродненская областная клиническая больница»

Актуальность. Существует большая группа заболеваний желудочно-кишечного тракта, при которых, в первую очередь, поражается желудок или двенадцатиперстная кишка. К ним относятся: язвенная болезнь, эрозивные и поверхностные гастриты, рефлюкс-гастриты, бульбиты, дуодениты и др. Известно, что одну из главенствующих ролей в патогенезе этих заболеваний играет *Helicobacter pylori* (HP). До недавнего времени считалось, что гепатобилирная система при геликобактерной инфекции остается интактной. На самом деле это не так. Бактериальная ко-инфекция, особенно бактериями рода *Helicobacter*, может играть существенную роль в морфологических изменениях печени при поражении вирусом [[64]]. В последние годы число новых энтерогапатических геликобактерий растет, изучение их возможного патологического влияния на организм очень важно. Кроме того, эти исследования будут стимулировать появление новых работ для того, чтобы уточнить роль бактерий рода *Helicobacter* в патогенезе заболеваний у человека [6].

После описания в 1983 г. Маршаллом (Marshall) и Уорреном (Warren) обитающего в желудке микроорганизма, который первоначально назывался *Campilobacter pylori*, а с 1989 г. - HP, началась новая эра в изучении этиологии, патогенеза, диагностики, лечения и профилактики язвенной болезни желудка (ЯБЖ) и двенадцатиперстной кишки (ДПК) [5]. Ведущая роль инфекции HP в возникновении антрального гастрита, пептических язв желудка и ДПК, мальтомы и рака желудка является общепризнанной [11, 20, 22, 44, 53, 57]. Практически в каждой клинике можно выполнить исследования на обнаружение HP. Подробно изучены свойства возбудителя, патогенез, клинические проявления, разработана диагностика и схемы эрадикации, а также условия, при которых возможна колонизация HP слизистой оболочки желудка и ДПК [1, 57].

Характеристика HP. Геликобактерии относятся к роду *Helicobacter*, представляют мелкие грамотрицательные бактерии изогнутой или слегка спиральной формы. В мазках из патологического материала располагаются попарно (форма «лета-

щей ласточки»), имеют жгутики (в пучке до 6). Очень требовательны при культивировании к условиям аэрации и составу питательной среды (требуют наличия лошадиной или эмбриональной телочек сыворотки, растворимого крахмала, активированного угля, низкомолекулярного гидролизата белков). Важнейшим родовым признаком является продуцирование высокоактивной уреазы, сахара не сбраживает. Отличается высокой рекомбинантной и мутационной изменчивостью. Возбудитель выживает до 2 недель в холодной воде, обнаруживается в глубине желудочных ямок и на поверхности эпителиальных клеток, в основном, под защитным слоем слизи, выстилающим оболочку желудка. Излюбленное место обитания HP – антральный отдел желудка [5].

Эпидемиология. В эпидемиологии геликобактерной инфекции имеют значение географические, социально-экономические факторы, возраст, профессия. Особенно широко инфекция распространена на африканском континенте. В развитых странах инфицированность меньше. Основным механизмом передачи HP является фекально-оральный (алиментарный), который реализуется через водный, реже через пищевой фактор. Инфицирование происходит при употреблении зараженной питьевой воды, а также при употреблении в пищу сырых овощей, для поливки которых использовалась загрязненная вода. Дополнительные механизмы реализуются через контакты: орально-оральный – при поцелуях, ятрогенный – через недостаточно продезинфицированные эндоскопы и щипцы для биопсий [5, 36]. HP обнаруживается в большинстве проб слюны, рвотных массах, стуле здоровых инфицированных взрослых и детей, во время рвоты. Возбудитель (HP) можно выделить из воздуха [30, 42, 58].

Чем ниже социально-экономический статус населения, тем выше риск инфицирования. Возможно, это связано с использованием населением загрязненной питьевой воды, так как геликобактерная инфекция передается *per os*. Первичное инфицирование HP обычно происходит в детстве и при отсутствии лечения HP персистирует в организме неопределенно долго. Частота инфицирования HP

детей от 2 до 8 лет в развивающихся странах составляет 10% в год и достигает почти 100% у взрослых [5]. В семьях, где инфицирован один родитель, инфицировано 85% детей. Если родители не инфицированы, *HP* позитивными оказываются только 22% детей [19, 30, 43, 53].

Патогенез. Бактерия обладает многочисленными механизмами вирулентности и патогенности, опосредуя свое действие через цитокины, вызывает воспаление, повреждение и метаплазию слизистой оболочки желудка и ДПК [2,4,5,35]. Метаплазия кишечного эпителия встречается у 90% больных с язвой ДПК, при этом происходит замена дуоденального эпителия, покрывающего ворсинки ДПК, на желудочный эпителий. Адгезия *HP* происходит за счет специфических рецепторов. Уреаза, другие ферменты и токсины, продуцируемые бактерией, обладают прямым повреждающим действием на организм хозяина [50]. Для развития гастрита необходима адгезия вирулентных *HP* с эпителием, только после этого начинается экспрессия провоспалительных цитокинов и воспалительная инфильтрация. После адгезии и «впрыскивания» *сag A+*, одного из генов, индуцирующих секрецию интерлейкина-8 (ИЛ-8) в эпителиальные клетки желудка, они начинают вырабатывать ИЛ-8 – хемотаксический цитокин, который привлекает в слизистую оболочку нейтрофиллы и моноциты. Последние, в свою очередь, экспрессируют ИЛ-1 β , который обладает двумя основными свойствами. Во-первых, как всякий провоспалительный цитокин, стимулирует воспалительную реакцию, во-вторых, снижает секрецию кислоты. ИЛ-1 β считается одним из наиболее мощных ингибиторов соляной кислоты. Есть данные о том, что его эффект в 100 раз превосходит действие ингибиторов протонной помпы и в 6000 раз – антагонистов гистаминовых рецепторов [1].

HP фенотипически может быть разделен на две группы или на два типа. Первый тип содержит токсин, кодируемый геном *vacA*, и цитотоксический протеин, кодируемый геном *сagA*. 2 тип содержит нецитотоксические *vacA* и *сagA* гены. Первый тип вызывает более выраженное воспаление, чем второй тип. Этим объясняется тот факт, что у части инфицированных больных не развивается заболевание, тогда как у другой части развивается язвенная болезнь или рак желудка [23].

Непосредственно вокруг себя микроорганизм поддерживает pH около 6,2, в то время как в окружающей среде pH может быть от 4 до 8. *HP* выживает даже при более низком значении pH. Такие условия жизнедеятельности достигаются при помощи уреазы, которая ответственна за образование аммония и, таким образом, позволяет бактерии оставаться в живых в кислой среде желудка.

При этом часть фермента связана с клеточной поверхностью *HP*, не связанная с клеткой уреазы необходима для выживания соседних микроорганизмов, контактирующих с кислой средой. При понижении желудочной секреции и величине pH более 8,0 микроорганизм погибает в антральном отделе и выживает в теле и дне желудка [5]. Уреаза-негативные штаммы *HP* не способны колонизировать слизистую желудка у млекопитающих [10].

Морфологическим субстратом гиперсекреции является почти двукратное увеличение массы париетальных клеток и повышение их функциональной активности. Обычно это генетически обусловленный феномен, но можно допустить и активный процесс - гиперплазию париетальных клеток, развивающуюся в результате не только действия социально-экономических условий, факторов внешней среды, но и свойственной *HP*-инфекции гипергастринемии [1]. Было установлено, что *HP* усиливает секрецию гастрина как у здоровых людей, так и у больных с язвой ДПК. D-клетки вырабатывают главный ингибитор секреции гастрина - соматостатин. Установлено, что у *HP*-позитивных лиц уровень соматостатина снижен [23].

Генетические особенности микроорганизма сказываются на выраженности воспалительной реакции, но они не могут определить клинические последствия *HP*-инфекции. *HP* непосредственно не вызывает ни дуоденальную язву, ни рак желудка. *HP* является причиной хронического гастрита, с особенностями которого и связаны клинические последствия *HP*-инфекции, т.е. *HP* участвует в патогенезе не в качестве ульцерогена или канцерогена, а опосредованно [1]. В зависимости от сочетания уровня секреции соляной кислоты и вирулентности *HP* можно ожидать различные клинические проявления инфекции (модель Graham). Доказан повышенный риск дуоденальной язвы и рака желудка при высокой вирулентности *HP* [1].

Таким образом, в течение многих лет исследовательской работы были изучены практически все аспекты, касающиеся роли *HP* в заболеваниях верхнего отдела пищеварительного тракта.

Роль *Helicobacter pylori* в заболеваниях ГБС. Совершенно иначе дело обстоит с изучением роли бактерий рода *Helicobacter* в заболеваниях гепатобилиарной системы (ГБС). Предположение о возможном участии *HP* в этиологии заболеваний печени высказывается на протяжении последних 15 лет. Было выполнено много исследовательских работ, направленных на то, чтобы доказать роль бактерий рода *Helicobacter* в развитии заболеваний ГБС у животных и людей. В последние годы в ряде западных стран проводились исследования, направленные на уточнение роли *HP* в развитии заболеваний печени и желчевыводящей системы.

В настоящее время подробно изучено более чем 25 видов бактерий рода *Helicobacter*, в основном бактерии, которые колонизируют крипты кишечника и могут быть причиной гастроэнтеритов [6]. Было доказано, что, по крайней мере, 4 из них были устойчивы к агрессивным свойствам желчи и ассоциировались с хроническими инфекциями печени, билиарного дерева и поджелудочной железы человека, других млекопитающих и птиц [6, 32]. Высказывались предположения, что многие из бактерий, которые колонизируют крипты кишечника, кроме того, способны колонизировать билиарный тракт и вызывать гепатит у животных и в некоторых случаях они могут вызвать рак печени [6, 9, 12, 31, 38, 40, 51, 54].

В 1996 году у японского пациента с калькулезным холециститом в ткани желчного пузыря была обнаружена ДНК бактерии, подобная на ДНК *HP* [24]. В 1997 году было показано, что геликобактерная инфекция широко распространена у больных циррозом печени [54], что не было подтверждено другими авторами [59]. Считалось, что еще не выделен вид бактерий рода *Helicobacter* «уреазо-положительный», как и «уреазо-отрицательный», который мог бы колонизировать интестинальный тракт человека, как это было описано у собак и кошек [29]. При помощи электрофореза было установлено, что штамм *HP*, выделенный у мышей так же, как *Chlamydia pneumoniae*, вызывает проатеросклеротическое повреждение эндотелия у мышей [32].

Установлено, что *HP* чувствителен к агрессивному действию большинства желчных кислот человека *in vitro*, в частности, к дезоксихолевой и хенодезоксихолевой кислотам [21], что опровергло возможность *HP* колонизировать печень. Однако *HP* способен адаптироваться к желчным кислотам *in vivo*, что было показано в исследованиях, установивших способность *HP* выживать в фекалиях [26]. Более того, при некоторых патологических состояниях, таких, как обструкция желчных протоков, установлено, что действие факторов, ингибирующих рост *HP*, уменьшается [63]. Кроме того, считается, что при дуоденогастральном рефлюксе рост *HP* в антральном отделе не ингибируется [25].

Рядом авторов окончательно был установлен факт наличия ДНК *HP* в ГБС у людей, страдающих самыми различными заболеваниями печени и желчевыводящих путей. ДНК *HP* была обнаружена при помощи ПЦР в желчи больных хроническим холециститом [12, 31, 38, 39]. Методом ПЦР, используя *ureA* ген, в образцах желчи, полученных при помощи чрезкожного транспеченочного холангиодренажа у больных с опухолью головки поджелудочной железы, была выявлена ДНК *HP*

у 3 из 7 человек, что позволило предположить наличие взаимосвязи *HP* с асимптоматическим холангитом [31]. В другом исследовании, проведенном в Югославии, была обнаружена ДНК *HP* в желчи больных холангитом, сочетающимся с карциномой желчевыводящих путей, а при неосложненном течении ЖКБ (без билиарных заболеваний) – нет [7]. Т.Т. Lin и др. (1995) получили положительный результат в ПЦР на ген *ureA HP* в желчи 3 больных с первичной или метастатической опухолью поджелудочной железы, а у 4 пациентов с заболеваниями билиарной системы результат был отрицательным [31]. Наряду с этим, результаты гибридизации подтвердили наличие последовательностей генов *HP* в образцах печени, полученных от больных хроническими холестатическими заболеваниями печени [39].

Долгое время не было сообщений о том, что из желчных протоков человека выделен сам *HP*, хотя ДНК *HP* выделяли из желчи неоднократно [41]. В 2001 году впервые из печени больного с циррозом был выделен штамм *HP*, подтверждающий то, что бактерии рода *Helicobacter* жизнеспособны в ткани печени человека, как это было уже известно у животных [45]. В этом же году штамм, подобный *HP*, был выделен из печени у женщины с циррозом, страдающей болезнью Вильсона, что подтвердило возможность инфицирования печени людей бактериями вида *Helicobacter*, однако не удалось установить, был ли микроорганизм выделен из пораженной ткани печени или из желчных протоков [45].

В связи с тем, что микроорганизмы рода *Helicobacter*, резистентные в желчи, требовательны к условиям выращивания, их очень трудно культивировать. Обычно бактерии культивируют на GAB-CAMP агаре без добавления антибиотиков в течение 3 дней в микроаэрофильных условиях [6], однако не всегда это удается. В то же время для выделения *HP* из ткани печени вне операции приходится выполнять биопсию печени, которая невозможна у многих пациентов из-за риска кровотечения и сложности манипуляции. Перспективным является определение антител к *HP* у больных, страдающих заболеваниями ГБС. Так, в одном исследовании был выявлен высокий уровень антител к *HP* в сыворотке больных с заболеваниями печени [54]. В то же время следует учитывать возможность перекрестного реагирования антител к геликобактериям различных видов. Для этого применяется метод абсорбции, позволяющий дифференцировать *HP* от других кишечных геликобактерий [6].

Роль других бактерий рода *Helicobacter* в заболеваниях ГБС. Бактерии рода *Helicobacter* были выделены из желчи, желчного пузыря и ткани пе-

чени у многих животных. *H. bilis* и *H. hepaticus* были идентифицированы у мышей [15, 60, 62], *H. pullorum* у птиц [55], *H. canis* у собак [13], *H. cholecystus* у Сирийских хомяков [16], *H. rappini* у плодов овец [27]. Практически все случаи были ассоциированы с заболеваниями гепатобилиарной системы. Для изучения роли бактерий рода *Helicobacter* при заболеваниях печени и ГБС были созданы различные экспериментальные модели на животных. Установлено, что некоторые резистентные в желчи бактерии рода *Helicobacter* вызывают заболевания печени и желчных путей как у животных, так и у человека [8, 12, 39]. В настоящий момент известно, что у приматов определенный вид *Helicobacter* вызывает заболевания печени, желчевыводящих путей и поджелудочной железы [14].

Helicobacter hepaticus. Из всех геликобактерий, устойчивых к агрессивным свойствам желчи, наиболее изучен *H. hepaticus*. *H. hepaticus* (*HH*) был открыт в 1992 году в Национальном Институте Рака в США и впервые выделен у мышей [62]. После того как колонии мышей (A/JSr) интраперитонеально были введены бактерии *HH*, внутриспеченочные желчные протоки оказались инфицированы данным возбудителем, что доказывало этиологию данного агента в происхождении не только хронического гепатита, но и в развитии гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК), при этом было доказано, что ГЦК не была вызвана ни химическими веществами, ни вирусом. Из экстрацеллюлярного пространства печеночных протоков этой линии мышей можно было постоянно выделять *HH* [41, 47, 62].

HH привередлив к условиям культивирования, выращивается на агаре в течение 7-10 дней в микроаэрофильных условиях (3% H₂, 10% CO₂, 5% O₂, 82% N₂) при 37°C. Выраженные в таких условиях колонии имеют зеленую металлическую просвечивающуюся поверхность, они положительны на уреазу, каталазу и оксидазу [41]. Как и желудочные геликобактерии, *HH* обладает высоким уровнем уреазной активности. Роль уреазы *HH* в патогенезе колонизации эпителия еще подробно не изучена. Ген уреазы *ureB* *HH* гомологичен гену *ureB* *HP* (идентичность 71%) и к генам уреазы *ureA*, *ureB* других геликобактерий (*H. felis*, *H. mustelae*, *H. heilmannii*) до 83%, что может использоваться в последующем для ПЦР диагностики возбудителя [50].

Эпидемиология *HH*-инфекции у людей не изучена, однако установлено широкое распространение *HH* у мышей, содержащихся в искусственных условиях, и мышей, используемых для биомедицинских исследований [50].

Геликобактерии, устойчивые к агрессивному

действию желчи, имеют схожую антигенную и генетическую структуру. Высокая антителная реактивность сыворотки больных к поверхностным белкам *HH* указывает на то, что некоторые *Helicobacter*-сходные микроорганизмы могут играть важную роль в развитии заболеваний печени у людей [41]. Антитела к *HH* часто реагируют на *HP*, что было обнаружено у больных с алкогольным поражением печени [41]. Следует отметить, что у больных с хроническими заболеваниями печени невысокий уровень иммунного ответа на геликобактерную инфекцию, в частности, на инфекцию *HH*, может быть связан с угнетением синтеза белков, включая иммуноглобулины в поврежденной ткани печени [37]. В то же время установлено, что в контрольной группе доноров крови антителный ответ на *HH* достоверно выше, природа данного факта не была установлена [6]. Nilsson и др. при помощи иммуноблотинга разделили антитела к *HP* и *HH*. Было установлено, что 39% больных хроническими заболеваниями печени имеют положительный результат на иммуноглобулины G к *HH*. После абсорбции 30% больных оставались положительными, подтверждая предыдущий результат, также было установлено, что злоупотребление алкоголем вызывает местный иммунный дефект и активацию латентной геликобактерной инфекции [41].

В 1996 году было выявлено, что антитела к *HH* оказались иммунореактивны к гепатоцитам инфицированной печени мышей, что свидетельствовало об аутоиммунных механизмах повреждения печени и эпителия желчных протоков при инфицировании *HH* [61].

Helicobacter cholecystus. В 1996 году Franklin и др. [16] сообщили, что новый вид геликобактерий – *H. cholecystus* был выделен из желчных протоков сирийских хомяков с наличием у них хронического воспаления желчного пузыря и панкреатита. Кроме того, появились данные о том, что *H. cholecystus* способен вызывать панкреатит не только у хомяков, но и у приматов [32].

Другие бактерии рода Helicobacter. Было установлено, что кишечные виды бактерий рода *Helicobacter* были обнаружены с различной частотой у больных различных географических регионов (Япония, Таиланд, Чили) [12, 33], что, возможно, связано с тем, что в одних исследованиях изучалось городское население, в других сельское. Можно предположить, что сельские жители имели больше шансов на инфицирование кишечными видами бактерий от домашних животных, которые могут колонизировать гепатобилиарный тракт людей легче, чем другие желудочные виды бактерий рода *Helicobacter* [52]. В исследованиях в Германии [49] и Мексике [34] ДНК бактерий рода

Helicobacter в желчи или в ткани желчного пузыря у больных гепатобилиарными заболеваниями не была обнаружена. С другой стороны, отрицательные результаты исследований во многих работах можно объяснить отсутствием, в большинстве случаев, контрольных групп или небольшим количеством пациентов для контроля [52].

Окончательно неизвестно, играют ли бактерии рода *Helicobacter*, присутствующие в билиарном дереве человека, роль в патогенезе билиарных заболеваний. Ряд авторов полагает, что наличие ДНК бактерий в желчи и стенке желчных протоков близко связано с гистологической картиной воспаления слизистой оболочки желчного пузыря. Установлено, что геликобактерная инфекция действительно ассоциируется с заболеваниями желудка у людей и представляет фактор, влияющий на формирование рака желудка и язвы желудка. Однако, несмотря на то, что эти факты указывают на действительную связь, нельзя исключить, что бактерии не заселили уже предварительно поврежденный эпителий. В связи с этим можно предположить, что инфекция-*Helicobacter* может быть дополнительным фактором в формировании опухолей билиарной системы у человека. К тому же Kuroki и др. [28] продемонстрировали, что уровень пролиферации эпителия (состояние, предшествующее канцерогенезу) был выше в *Helicobacter*-положительном билиарном эпителии, чем в *Helicobacter*-негативном эпителии [52].

В 1998 году J. Fox сделал вывод, что бактерии рода *Helicobacter* могут вызывать хроническое воспаление желчного пузыря у людей с опухолями желчных протоков и желчного пузыря, и установил потенциальную роль *HN*, *H. pullorum*, *H. bilis* and *H. canis*, устойчивых в желчи видов *Helicobacter*; в развитии хронического холецистита и заболеваний печени [12, 32].

Клиника. Клиническая картина заболеваний желудочно-кишечного тракта, обусловленная возбудителем *Helicobacter pylori*, достаточно полно освещена в настоящее время [1, 20, 23, 57]. В то же время, по литературным данным, клиническая картина заболеваний гепатобилиарной системы, в развитии которых предполагается участие геликобактерий, недостаточно изучена. Известно, что пациенты с положительными результатами ПЦР на гены *Helicobacter* имели достоверно повышенные уровни щелочной фосфатазы и комплекса протромбина, к которому относятся факторы свертывания крови II, VII, X [39]. У больных с первично склерозирующим холангитом положительная ПЦР была также ассоциирована с язвенным колитом. Достоверных различий относительно групп крови и HLA статуса выявлено не было [39]. Два случая энтерита у людей были ассоциированы с *H. Pullo-*

rum [56]. Появилось сообщение [54] о широком распространении геликобактерной инфекции у больных циррозом печени, что не было подтверждено другой работой [59]. При помощи ПЦР и иммуногистохимии был обнаружен микроорганизм, подобный *HP*, в слизистой желчного пузыря 41-летней женщины, поступившей в больницу с клиникой острого холецистита [24].

Диагностика. Выделение и идентификация возбудителей. Методы выделения геликобактерий зависят от вида бактерий: *Helicobacter pullorum*, *Helicobacter bilis*, *Helicobacter hepaticus* культивируются на кровяном агаре с добавлением 5% лошадиной сыворотки, 5% крови барана и других средах. *H. pullorum* и *H. bilis* выращивают в течение 3 дней, а *H. hepaticus* – 5 дней в микроаэрофильных условиях (3% H₂, 10% CO₂, 5% O₂, and 82% N₂) при 37°C.

Выделение бактерий в культуре представляет очень сложным, что может быть вследствие того, что ДНК, определяемая при помощи ПЦР в исследованиях, могла быть обнаружена из неживых организмов. Помимо этого, существует несколько возможных причин того, что бактерии нельзя было выделить. Во-первых: большинство больных до операции, после которой производился забор материала, получали антибиотики. Во-вторых: образцы замораживались без какого-либо защитного раствора, который мог бы сохранить жизнеспособность бактерий. Также количество бактерий было очень невелико, и они могли быть частично ингибированы вредными условиями в желчной среде. Можно предположить, что штаммы бактерий имеют некоторые отличительные особенности, условия роста, которые еще не известны. Эти факты указывают на то, что необходимо создать лучшие условия для роста бактерии рода *Helicobacter* из желчи, подробнее охарактеризовать микроорганизм, создать экспериментальную модель для изучения роли геликобактерий в генезе билиарных заболеваний [52].

Серологические исследования – наиболее важный диагностический метод, так как его несложно выполнить и стандартизировать. Важность последующего изучения роли новых видов *Helicobacter* в заболеваниях печени у людей определяется тем, что необходимо развить неинвазивные серологические методы для подтверждения геликобактерного поражения печени [41]. Большинство пациентов с первичным билиарным циррозом и первично склерозирующим холангитом имеют антитела к антигенам *H. pylori* and *H. pullorum* [32]. Вероятно, бактерии рода *Helicobacter* имеют общие антигены [17, 18, 41].

Следует учитывать перекрестные реакции между антигенами различных видов геликобактерий,

поэтому необходимо использовать метод абсорбции, пока не удастся выделить специфические белки для каждого вида [6]. В качестве контроля берутся доноры крови, доноры печени, люди с ожирением, которым показана холецистэктомия, так как они не имеют различий с общей популяцией относительно геликобактерной инфекции желудка [6, 46, 52].

Серологические исследования позволяют определять специфические иммуноглобулины. Тест полезен для выявления больных с НР инфекцией из общей популяции. Он довольно чувствителен и специфичен, недорог. К недостаткам относятся: ограниченное применение при диагностике острой инфекции и подтверждении эрадикации [23].

Техника забора материала: образцы желчи берутся сразу после выполнения холецистэктомии, немедленно замораживаются при температуре -80°C . Для морфологии: фиксация в 10% забуференном формалине сразу после холецистэктомии. Далее помещаются в парафин и делают 5- μm -срезы, окрашивают гематоксилином и эозином. Анализ производится специалистом, не знающим происхождения препарата. Диагноз холецистита базируется на обнаружении моно- или полинуклеарных воспалительных клеток в собственной пластинке, сглаживании слизистых складок, крипт и наличие синусов Рокитанского Ашоффа [52].

Микробиологическое исследование: ткань желчного пузыря и желчь отдельно гомогенизируют в 0,5 мл кровяном heart infusion бульоне в стеклянном tissue grinder и помещают onto petri dishes со свежеприготовленным Belo Horizonte medium. Чашки инкубируют в микроаэрофильных условиях при 37°C вплоть до 21 суток. Следует учесть, что бактерии вырастают не всегда [52].

Диагностика геликобактерной инфекции проводится морфологическим методом с окраской бактерий в препаратах слизистой желудка по Гимза, цитологическим – с окраской мазков-отпечатков биоптатов по Граму и уреазным экспресс-методом с использованием 2% раствора мочевины [3]. Образцы должны быть запарафинены для гистологического исследования и далее вымываются в кислоте и этаноле. Биопсийный материал (от 15 до 20 мг/экземпляр) гомогенизируется в 300 μl phosphate-buffered saline (pH 7.2) при помощи plastic microcentrifuge tube-adapted pestle [39].

Rapid urease test (RUT) на 90% чувствителен и на 100% специфичен, недорогой и дает ответ в течение 20 минут. Уреаза, продуцируемая бактериями, гидролизуется в аммоний. При этом изменяется pH и меняется цвет индикатора с желтого на розовый. Ложно отрицательные результаты могут быть получены, если количество бактерий небольшое и если перед биопсией принимались бло-

каторы протонной помпы, антибиотики, препараты висмута, когда НР колонизировал тело или дно желудка [23]. Уреазный дыхательный тест, несмотря на его высокую стоимость, чувствителен и специфичен, а так же идеален для контроля эрадикации. Определение меченых CO_2 в выдыхаемом воздухе указывает на гидролиз мочевины и наличие микроорганизма, продуцирующего уреазу в желудке [23]. Пик активности уреазы НР наблюдается при кислом значении pH, что не происходит у *H. muridarum*, другого вида *Helicobacter*, способного колонизировать не только слизистую кишечника, но слизистую желудка мышей.

У больных холангио- и гепатокарциномой бактерии могут быть визуализированы при помощи иммуногистохимии [32].

Удачные попытки выделить штаммы из образцов печени и желчи вместе с улучшенным серологическим анализом помогут в дальнейшем изучить возможную роль геликобактерий, устойчивых в желчи, в многочисленных заболеваниях печени и билиарного тракта [41].

Молекулярно-генетические методы. Несмотря на существование нескольких десятков видов геликобактерий, полностью дифференцировать каждый вид в отдельности в настоящее время является сложной задачей. Большинство исследователей в своих работах для доказательства роли бактерий рода *Helicobacter* применяют ПЦР диагностику ДНК бактерий в различных биологических материалах при помощи традиционной 16S rRNA, которая на 97,8-99,3% совпадает с ДНК НР [32, 52].

ДНК бактерий рода *Helicobacter* была обнаружена в различных биологических материалах, полученных от гепатологических больных с холангиокарциномой или гепатоцеллюлярной карциномой [38], с хроническим холециститом [12], другими воспалительными заболеваниями желчевыводящих протоков [48]. У больных с карциномой желчных протоков или желчного пузыря был обнаружен более высокий уровень ДНК *H. bilis*, чем у людей без злокачественных заболеваний билиарного дерева [33]. ДНК геликобактерий выявлялась достоверно чаще в группах пациентов с холестатическими заболеваниями печени, чем у пациентов с поражением печени без холестаза; так, у пациентов с первичным билиарным циррозом (ПБЦ) и первичным склерозирующим холангитом (ПСХ) желчь и образцы печени были ПЦР положительными на ДНК *Helicobacter* почти у 50% больных, а в контрольной группе без патологии печени ПЦР была отрицательная [39]. Предпринимались попытки обнаружить последовательность генов бактерий рода *Helicobacter* как в общем, так и отдельно гены *HP*, *H. Bilis*, *H. Pullorum*, *HN* в образцах печени пациентов с ПСХ, имеющим воз-

можную инфекционную этиологию. Преобладание того или иного вида геликобактерий при ПСХ и ПБЦ было недостоверно [39].

В одном исследовании проводилось определение ДНК геликобактерий при наиболее распространенной патологии гепатобилиарной системы - желчнокаменной болезни и холецистите. ДНК бактерий рода *Helicobacter* была обнаружена в ткани желчного пузыря и желчи в 31,3% и 42,9%, соответственно. Было установлено, что холелитиаз достоверно чаще сочетался с женским полом, увеличением возраста и присутствием ДНК бактерий рода *Helicobacter* в ткани желчного пузыря. Присутствие ДНК геликобактерий в желчи не ассоциировалось с холелитиазом. Также было достоверно сочетание присутствия ДНК геликобактерий в эпителии желчного пузыря и морфологической картиной холецистита [52]. У больных холециститом в ткани желчного пузыря и желчи была обнаружена ДНК в 50% и 23,3%, соответственно. У 15 из 16 (93,8%) ДНК положительных были признаки воспаления (холецистита), у 13 из 35 (37,1%) были признаки воспаления при отрицательном тесте на ДНК геликобактерий [52]. С другой стороны, не было связи с наличием ДНК *HP* в желчи и воспалением слизистой желчного пузыря. Последовательность ДНК, обнаруженной в исследовании, на 97,8%-99,3% совпадала с ДНК *HP* [52].

Присутствие ДНК бактерий рода *Helicobacter* неоднократно исследовалось в желчи и билиарной ткани людей с заболеваниями ГБС, однако были получены противоречивые результаты. В некоторых исследованиях присутствие ДНК кишечных видов геликобактерий или ДНК *HP* было достоверным при доброкачественных и злокачественных заболеваниях ГБС. С другой стороны, другие авторы не смогли обнаружить ДНК геликобактерий в билиарном дереве у больных с точно такой же патологией [52]. Возможно, определенную роль сыграло различное географическое расположение исследований. ДНК *HP* постоянно обнаруживалось в образцах билиарной ткани только тогда, когда применялась чувствительная гнездная ПЦР [7, 28, 31]. Чувствительность традиционной 16S rRNA PCR является на порядок ниже, она дает положительный результат, когда концентрация бактерий более чем 10^3 CFU/ μ l. Однако, кишечные виды бактерий рода *Helicobacter* были обнаружены при помощи обычной ПЦР, сопровождавшейся, а в некоторых случаях нет, гибридизацией [12, 33]. Эти исследования предполагают, что различные виды *Helicobacter* могут присутствовать в билиарном дереве человека, но численность микроорганизмов может быть разной соответственно виду бактерий, так как некоторые кишечные виды *Helicobacter* могут быть в большем количестве, чем *HP*. Это

различие может быть объяснено тем фактом, что кишечные виды *Helicobacter*, такие как *H. rappini*, *H. bilis*, *H. canis*, *H. cholecystus*, и *H. pullorum* устойчивы к желчи *in vitro*, т.е. обладают свойством, защищающим их от губительного воздействия желчи *in vivo*, что и приспособливает их лучше к гепатобилиарной среде [52].

Специфическая профилактика. Иммунизация мышей уреазой, взятой у бактерий рода *Helicobacter*, обеспечивает протективный эффект против инфекции *H. felis*, *H. pylori*. Исследования, показавшие, что уреазы способна индуцировать защитный иммунитет и предотвратить колонизацию *HP* *in vivo*, очень важны для развития вакцины против *Helicobacter* [50].

Заключение. Приведенный аналитический обзор последних сведений о роли геликобактерной инфекции в патогенезе патологии печени и желчного пузыря свидетельствует о неоднозначности и противоречивости результатов исследований. Тем интереснее будут восприняты результаты дальнейших исследований в данном направлении.

Литература

1. Аруин Л.И. *Helicobacter pylori*: каким образом один возбудитель вызывает разные болезни // Эксп. и клинич. гастроэнтерология. - 2004. - №1. - С. 36-41.
2. Аруин Л.И., Капуллер Л.Л., Исаков В.А. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника. - М.: Триада-Х, 1998. - 496 с.
3. Воронина Л.П. Перспектива эрадикации *HP* при использовании азитромицина у пациентов с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки // Мед. новости. - 2000. - №9. - С. 65-66.
4. Конорев М.Р., Литвяков Л.М., Титов Л.П. Современные представления о *Helicobacter pylori* // Мед. новости. - 1998. - №7. - С.15-20.
5. Пиманов С.И. Современные принципы антихеликобактерной терапии у больных язвенной болезнью и хроническим гастритом // Мед. новости. - 2000. - №3. - С. 4-6.
6. Ananieva O., Nilsson I., Vorobjova T. et al. Immune Responses to Bile-Tolerant *Helicobacter* Species in Patients with Chronic Liver Diseases and Randomized Population Group and Healthy Blood Donors // Clinical and Diagnostic Labor. Immunology. - 2002. - Vol. 9. - P.1160-1164.
7. Bulajic M. P., Maisonneuve W., Schneider-Brachert P. et al. *Helicobacter pylori* and the risk of benign and malignant biliary tract disease // Cancer. - 2002. - Vol. 95. - P.1946-1953.
8. Burnens A. P., Stanley J., Morgenstern R. et al. Gastroenteritis associated with *Helicobacter pullorum* // Lancet. - 1994. - Vol. 344. - P.1569-1570.
9. Calvet X., Navarro M., Gil M. et al. Seroprevalence and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in patients with cirrhosis // Hepatol. - 1997. - Vol. 26. - P.1249-1254.
10. Eaton K., Krakowka S. A virulent, urease-deficient *Helicobacter pylori* colonises gastric epithelial explants *ex vivo* // Scand. J. Gastroenterol. - 1995. - Vol. 30. - P. 434-437.
11. Forman D. Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from prospective investigation // Br. Med. J. - 1991. - Vol. 302. - P. 1302-1305.
12. Fox J. G., Dewhirst F. E., Shen Z. et al. Hepatic *Helicobacter* species identified in bile and gallbladder tissue from Chileans with chronic cholecystitis // Gastroenterology. - 1998. - Vol. 114. - P. 755-763.
13. Fox J. G., Drolet R., Higgins R. et al. *Helicobacter canis* isolated from a dog liver and multifocal necrotizing hepatitis // J. Clin. Microbiol. - 1996. - Vol. 34. - P. 2479-2482.
14. Fox J. G., Handt L., Sheppard B. J. Isolation of *Helicobacter cinaedi* from the colon, liver, and mesenteric lymph node of a rhesus monkey with chronic colitis and hepatitis // J. Clin. Microbiol. - 2001. - Vol. 39. - P.1580-1585.
15. Fox J. G., Yan L. L., Dewhirst F. E. et al. *Helicobacter bilis* sp. nov., a novel *Helicobacter* species isolated from bile, livers, and intestines of aged, inbred mice // J. Clin. Microbiol. - 1995. - Vol. 33. - P. 445-454.

16. Franklin C. L., Beckwith C. S., Livingston R. S. et al. Isolation of a novel *Helicobacter* species, *Helicobacter cholecystus* sp. nov., from the gallbladders of Syrian hamsters with cholangiofibrosis and centrilobular pancreatitis // *J. Clin. Microbiol.* - 1996. - Vol. 34. - P. 2952-2958.
17. Ge Z., Doig P., Fox J. G. Characterization of proteins in the outer membrane preparation of a murine pathogen *Helicobacter bilis* // *Infect. Immun.* - 2001. - Vol. 69. - P. 3502-3506.
18. Ge Z., Feng Y., White D. Et al. Genomic characterization of *Helicobacter hepaticus*: ordered cosmid library and comparative sequence analysis // *FEMS Microbiol. Lett.* - 2001. - Vol. 204. - P. 147-153.
19. Goodman K., Gorre P. Transmission of *Helicobacter pylori* among sublings // *Lancet.* - 2000. - Vol. 355. - P. 258-262.
20. Graham D. *Helicobacter pylori* infection in the pathogenesis of duodenal ulcer and gastric cancer // *Gastroenterology.* - 1997. - Vol. 113. - P. 1983-1991.
21. Hinninen, M. L. Sensitivity of *Helicobacter pylori* to different bile salts // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* - 1991. - Vol. 10. - P. 515-518.
22. Hirayama F. Induction of gastric ulcer and intestinal metaplasia in Mongolian gerbils infected with *Helicobacter pylori* // *Gastroenterology.* - 1996. - Vol. 31. - P. 755-757.
23. Joshi Y.K. *Helicobacter pylori* infection: current status // *J. of Indian Academy of clinical medicine.* - 2000. - Vol. 5(2). - P. 148-155.
24. Kawaguchi M., Saito T., Ohno H. et al. Bacteria closely resembling *Helicobacter pylori* detected immunohistologically and genetically in resected gallbladder mucosa // *J. Gastroenterol.* - 1996. - Vol. 31. - P. 294-298.
25. Kellosalo J., Alavaikko M., Laitinen S. Effect of biliary tract procedures on duodenogastric reflux and the gastric mucosa // *Scand. J. Gastroenterol.* - 1991. - Vol. 26. - P. 1272-1278.
26. Kelly S. M., Pitcher M. C., Farmery S. M. et al. Isolation of *Helicobacter pylori* from feces of patients with dyspepsia in the United Kingdom // *Gastroenterology.* - 1994. - Vol. 107. - P. 1671-1674.
27. Kirkbride C. A., Gates C. E., Collins J. E. et al. Ovine abortion associated with an anaerobic bacterium // *J. Am. Vet. Med. Assoc.* - 1985. - Vol. 186. - P. 789-791.
28. Kuroki T., Fukuda K., Yamanouchi K. et al. *Helicobacter pylori* accelerates the biliary epithelial cell proliferation activity in hepatolithiasis // *Hepato-Gastroenterol.* - 2002. - Vol. 49. - P. 648-651.
29. Lecoindre P., Chevallier M., Peyrol S. et al. Pathogenic role of gastric *Helicobacter* spp. in domestic carnivores // *Vet Res.* - 1997. - Vol. 28. - P. 207-215.
30. Leung W. et al. Isolation of *Helicobacter pylori* from vomitus in children // *Gastroenterology.* - 1998. - Vol. 114 (abstract).
31. Lin T. T., Yeh C. T., Wu C. S. et al. Detection and partial sequence analysis of *Helicobacter pylori* DNA in the bile samples // *Dig. Dis. Sci.* - 1995. - Vol. 40. - P. 2214-2219.
32. Ljungh E., Nilsson I., Abu Al-Soud W. *Helicobacter pylori* and bile-resistant *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric, hepatic, biliary and pancreatic diseases / Department of Medical Microbiology, Dermatology and Infection, MMDI, 1996.
33. Matsukura N., Yokomuro S., Yamada S. et al. Association between *Helicobacter bilis* in bile and biliary tract malignancies: *H. bilis* in bile from Japanese and Thai patients with benign and malignant diseases in the biliary tract // *Jpn. J. Cancer Res.* - 2002. - Vol. 93. - P. 842-847.
34. Mendez-Sanchez N., Pichardo R., Gonzalez J. et al. Lack of association between *Helicobacter* sp. colonization and gallstone disease // *J. Clin. Gastroenterol.* - 2001. - Vol. 32. - P. 138-141.
35. Modlin I., Sachs G. Acid related diseases. Biology and treatment. Konstanz. Schnetztor - Verlag, 1998. - 368 p.
36. Modlin I., Tytgat G. Treatment of Peptic Ulcer // *Digestion.* - 1998. - Vol. 59, №5. - P. 446-452.
37. Nardone G., Coscione P., D'Armiento F. P. et al. Cirrhosis negatively affects the efficiency of serologic diagnosis of *Helicobacter pylori* infection // *Ital. J. Gastroenterol.* - 1996. - Vol. 28. - P. 332-336.
38. Nilsson H. O., Mulchandani R., Tranberg K. G. et al. *Helicobacter* species identified in liver from patients with cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma // *Gastroenterology.* - 2001. - Vol. 120. - P. 323-324.
39. Nilsson H. O., Taneera J., Castedal M. Identification of *Helicobacter pylori* and other *Helicobacter* species by PCR, hybridization, and partial DNA sequencing in human liver samples from patients with primary sclerosing cholangitis or primary biliary cirrhosis // *J. Clin. Microbiol.* - 2000. - Vol. 38. - P. 1072-1076.
40. Nilsson I., Lindgren S., Eriksson S. et al. Analysis of antibodies to *Helicobacter hepaticus* in sera from patients with chronic liver disease // *Gut.* - 1998. - Vol. 43/2. - P. A117-118.
41. Nilsson I., Lindgren S., Eriksson S. et al. Serum antibodies to *Helicobacter hepaticus* and *Helicobacter pylori* in patients with chronic liver disease // *Gut.* - 2000. - Vol. 46. - P. 410-414.
42. Parsonnet J. Faecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults // *J. Med. Association.* - 1999. - Vol. 282. - P. 2240-2245.
43. Parsonnet J. Symptoms and risk factors of *Helicobacter pylori* infection in a cohort of epidemiologists // *Gastroenterology.* - 1992. - Vol. 102. - P. 41.
44. Parsonnet J. The incidence of *Helicobacter pylori* infection // *Pharmacology Ther.* - 1995. - Vol. 9. - P. 45-52.
45. Queiroz D. M., Santos M. A. Isolation of a *Helicobacter* strain from the human liver // *Gastroenterology.* - 2001. - Vol. 121. - P. 1023-1024.
46. Renshaw A. A., Rabaza J. R., Gonzalez A. M. et al. *Helicobacter pylori* infection in patients undergoing gastric bypass surgery for morbid obesity // *Obes. Surg.* - 2001. - Vol. 11. - P. 281-283.
47. Rice J. M. *Helicobacter hepaticus*, a recently recognized bacterial pathogen, associated with chronic hepatitis and hepatocellular neoplasia in laboratory mice // *Emerging Infect Dis.* - 1995. - Vol. 1. - P. 129-131.
48. Roe I. H., Kim J. T., Lee H. S. et al. Detection of *Helicobacter* DNA in bile from bile duct diseases // *J. Korean Med. Sci.*, 1999. - Vol. 14. - p. 182-186.
49. Rudi J., Rudy A., Maiwald M. et al. *Helicobacter* sp. are not detectable in bile from German patients with biliary disease // *Gastroenterology.* - 1999. - Vol. 116. - P. 1016-1017.
50. Shen Z., Schauer D.B., Mobley L.T. Development of a PCR-restriction fragment length polymorphism assay using the nucleotide sequence of the *Helicobacter hepaticus* urease structural genes ureAB // *J. Clin. Microbiology.* - 1997. - Vol. 35(5). - P. 1236-1238.
51. Shomer N. H., Dangle C. A., Schrenze M. D. et al. Cholangiohepatitis and inflammatory bowel disease induced by a novel urease-negative *Helicobacter* species in A/J and Tac:ICR:HascidRF mice // *Exp. Biol. Med.* - 2001. - Vol. 226. - P. 420-428.
52. Silva C. P., Pereira-Lima J. C., Oliveira A. G. Association of the presence of *Helicobacter* in gallbladder tissue with cholelithiasis and cholecystitis // *J. of Clinic. Microbiology.* - 2003. - Vol. 41(12). - P. 5615-5618.
53. Sipponen P. *Helicobacter pylori* gastritis - epidemiology // *Gastroenterology.* - 1997. - Vol. 32. - P. 273-277.
54. Siringo S, Vaira D, Menegatti R. et al. High prevalence of *Helicobacter pylori* in liver cirrhosis. Relationship with clinical and endoscopic features and the risk of peptic ulcer // *Dig. Dis. Sci.* - 1997. - Vol. 42. - P. 2024-2030.
55. Stanley J., Linton M., Burnens A. P. et al. *Helicobacter pullorum* sp. nov.-genotype and phenotype of a new species isolated from poultry and from human patients with gastroenteritis // *Microbiology.* - 1994. - Vol. 140. - P. 3441-3449.
56. Steinbrueckner B., Haerter G., Pelz K. et al. Isolation of *Helicobacter pullorum* from patients with enteritis // *Scand. J. Infect. Dis.* - 1997. - Vol. 29. - P. 315-318.
57. The European *Helicobacter Pylori* Study Group: current European concepts in management of *Helicobacter pylori* infection / The Maastricht Consensus Report // *Gut.* - 1997. - Vol. 41. - P. 8-13.
58. Thomas J. Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces // *Lancet.* - 1992. - Vol. 340. - P. 194-195.
59. Tsai C. J. *Helicobacter pylori* infection and peptic ulcer disease in cirrhosis // *Dig Dis Sci.* - 1998. - Vol. 43. - P. 1219-1225.
60. Ward J. M., Anver M. R., Haines D. C. et al. Chronic active hepatitis in mice caused by *Helicobacter hepaticus* // *Am. J. Pathol.* - 1994. - Vol. 145. - P. 959-968.
61. Ward J. M., Benveniste R. E., Fox C. H. et al. Autoimmunity in chronic active *Helicobacter hepaticus* of mice. Serum antibodies and expression of heat shock protein 70 in liver // *Am. J. Pathol.* - 1996. - Vol. 148. - P. 509-517.
62. Ward J. M., Fox J. G., Anver M. R. et al. Chronic active hepatitis and associated liver tumors in mice caused by a persistent bacterial infection with a novel *Helicobacter* species // *J. Natl. Cancer Inst.* - 1994. - Vol. 86. - P. 1222-1227.
63. Xu G. R., Kirk C. J., Goode A. W. Changes in biliary lipid concentrations in bile duct obstruction: an experimental study // *J. R. Soc. Med.* - 1986. - Vol. 79. - P. 522-527.
64. Young V. B., Chien C. C., Knox K. A et al. Cytolethal distending toxin in avian and human isolates of *Helicobacter pullorum* // *J. Infect. Dis.* - 2000. - Vol. 182. - P. 620-623.