

## Анализ изотопического состава выдыхаемого воздуха методами диодной лазерной спектроскопии в районе $2\ \mu\text{m}$ для диагностики *Helicobacter pylori*-ассоциированных заболеваний\*

© В.Т. Ивашкин<sup>1</sup>, С.Г. Касоев<sup>2</sup>, Е.В. Степанов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Первый государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, 119146 Москва, Россия

<sup>2</sup> Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, 119991 Москва, Россия

e-mail: eugenestepanov@yandex.ru

Поступила в редакцию 31.01.2019 г.

В окончательной редакции 20.02.2019 г.

Принята к публикации 26.02.2019 г.

Для диагностики заболеваний органов пищеварения, ассоциированных с инфекцией *Helicobacter pylori*, применен лазерный спектральный анализ изотопического отношения  $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$  в выдыхаемом воздухе, основанный на использовании перестраиваемых диодных лазеров. Для анализа изотопического состава выдыхаемого воздуха был разработан спектрофотометр на основе перестраиваемого диодного лазера. Для определения отношения  $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$  использовался спектральный диапазон вблизи  $2.05\ \mu\text{m}$ , в котором интерферируют *R*-ветвь полосы 20013–00001  $^{12}\text{CO}_2$  и *P*-ветвь полосы 20012–0001  $^{13}\text{CO}_2$ . Диагностика инфекции *H. pylori* в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) группы из 309 испытуемых осуществлялась с помощью  $^{13}\text{C}$ -урезного дыхательного теста ( $^{13}\text{C}$ -УДТ). Результаты дыхательного теста были сопоставлены с данными морфологического анализа слизистой желудка и двенадцатиперстной кишки, полученными при проведении фиброгастроуденоскопии. Для сопоставления результатов лазерного  $^{13}\text{C}$ -УДТ и гистологии было впервые предложено использовать суммарные значения результатов гистологического анализа биоптатов в теле желудка, в его дистальном отделе и двенадцатиперстной кишке. Проведен анализ зависимости результатов лазерного  $^{13}\text{C}$ -УДТ от возраста, нозологии, активности и выраженности воспалительного процесса, степени атрофии и метаплазии, а также типа используемой терапии. Показано, что распределение результатов лазерного  $^{13}\text{C}$ -УДТ у пациентов, полученные до и после эрадикационной терапии, отражают эпидемиологию заболеваний гастродуоденальной зоны, распространенность инфекцией *H. pylori*, закономерности колонизации ею ЖКТ, параметры воспалительного процесса, а также эффективность действия терапии и особенности восстановления колонии бактерий при неудачной терапии.

DOI: 10.21883/OS.2019.06.47774.55-19

### Введение

Методы диодной лазерной спектроскопии (ДЛС) могут быть эффективно использованы для высокочувствительного анализа изотопического состава выдыхаемого воздуха, в частности изотопического отношения  $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$  [1–7]. Изотопический анализ в свою очередь перспективен для неинвазивной медицинской диагностики, основанной на применении изотопических дыхательных тестов [8–10] с использованием нерадиоактивных материалов. Целесообразность применения перестраиваемых диодных лазеров (ПДЛ) для анализа изотопического состава  $\text{CO}_2$  в выдыхаемом воздухе обусловлена сложностью данной аналитической задачи, поскольку требуются высокие чувствительность и точность измерения спектров поглощения изотопомеров  $\text{CO}_2$ ,

обеспечивающие необходимую точность изотопического анализа. Использование современных ПДЛ позволяет выбрать наиболее удобную для анализа спектральную область. За счет возможности достаточно широкой перестройки частоты ПДЛ можно одновременно регистрировать линии поглощения обоих изотопомеров,  $^{12}\text{CO}_2$  и  $^{13}\text{CO}_2$ . С их помощью можно обеспечить высокую чувствительность при измерении оптической плотности на уровне  $10^{-6}$ – $10^{-7}$  [11,12] и решать задачи изотопической диагностики, используя слабые полосы поглощения. Электронное управление параметрами излучения ПДЛ позволяет сделать лазерные аналитические системы достаточно простыми в управлении, применять современные цифровые методы регистрации и обработки спектральных данных и значительно снижать уровень шумов и помех.

Для высокочувствительного (с погрешностью  $\sim 0.01\%$ ) детектирования вариаций изотопического состава  $\text{CO}_2$  в выдыхаемом воздухе нами был разработан лазерный анализатор, базирующийся на использовании ПДЛ ближнего ИК диапазона ( $2.05\ \mu\text{m}$ ). Ниже описаны

\* The 22nd Annual Conference Saratov Fall Meeting 2018 (SFM'18): VI International Symposium „Optics and Biophotonics“ and XXII International School for Junior Scientists and Students on Optics, Laser Physics & Biophotonics, September 24–29, 2018, Saratov, Russia. <https://www.sgu.ru/structure/fiz/saratov-fall-meeting/previous-conferences/saratov-fall-meeting-2018>

основные принципы его работы, оптическая схема и структура управляющего программно-аппаратного комплекса, регистрируемые спектры пропускания выдыхаемого воздуха, приведены основные параметры лазерного анализатора.

Цель данной работы состояла в апробации методов лазерного спектрального анализа и разработанного на их основе анализатора изотопического отношения  $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$  в выдыхаемом воздухе применительно к решению актуальных задач диагностики заболеваний органов пищеварения. Лазерный анализ использовался нами в ходе клинических исследований для определения изотопного состава  $\text{CO}_2$  в воздухе, выдыхаемом пациентами, проходившими обследование на инфицированность желудочно-кишечного тракта бактерией *H. pylori* [13–15]. Для обнаружения этой инфекции применялся  $^{13}\text{C}$ -уреазный дыхательный тест ( $^{13}\text{C}$ -УДТ) [10,13,14]. Для оценки эффективности применения лазерной диагностики в клинической практике результаты дыхательного теста было необходимо сопоставить с данными традиционно применяемых в клинической практике инвазивных диагностических методов, таких как морфологический анализ слизистой желудка и двенадцатиперстной кишки (ДПК) и фиброгастродуоденоскопия [10,13,14]. Необходимо было убедиться, что при всей простоте проведения  $^{13}\text{C}$ -УДТ лазерный изотопический анализ состава выдыхаемого воздуха дает точные и достоверные диагностические результаты. В частности, актуальным являлся анализ зависимости результатов лазерного  $^{13}\text{C}$ -УДТ от возраста, нозологии, активности и выраженности воспалительного процесса, степени атрофии и метаплазии слизистой, а также типа используемой терапии [13,14,16,17]. Для достижения поставленных целей было проведено несколько циклов исследований, в которых приняло участие более 300 испытуемых, страдающих различными *H. pylori*-ассоциированными заболеваниями органов пищеварения: хроническим гастритом, гастродуоденитом, эрозивным гастритом, эрозивным дуоденитом, язвенной болезнью желудка и ДПК. Ниже проводится анализ и обобщение полученного нами обширного экспериментального материала, который позволяет судить о высокой эффективности использования ПДЛ для неинвазивной диагностики наиболее распространенных гастроэнтерологических заболеваний.

## 1. Экспериментальные методы

Суть используемого диагностического подхода заключается в выявлении наличия в желудке или двенадцатиперстной кишке бактерии *H. pylori* и определения степени обсемененности этой бактерией слизистой, т.е. в некоторой количественной оценке степени инфицирования организма. Для этой цели используется  $^{13}\text{C}$ -уреазный дыхательный тест. При проведении теста испытуемый перорально принимает раствор меченой

стабильным изотопом  $^{13}\text{C}$  мочевины, которая разлагается в желудке или ДПК на  $^{13}\text{CO}_2$ , аммиак и воду под действием специфического фермента уреазы. Уреазы вырабатывается в желудке исключительно бактерией *H. pylori*, и поэтому дополнительное образование  $^{13}\text{CO}_2$  в организме и, в конечном счете, ее выделение с выдыхаемым воздухом обусловлено только присутствием этой бактерии в организме [9,10,13].

Основная цель анализа состоит в определении с максимальной чувствительностью различия изотопического состава  $\text{CO}_2$  в так называемых базальной и контрольной пробах выдыхаемого воздуха. Базальная проба отбирается у испытуемого до, а контрольная через некоторое время после принятия препарата, меченого стабильным изотопом углерода  $^{13}\text{C}$  (мочевины). Считается, что для обеспечения приемлемой достоверности результатов дыхательных тестов необходимо различать изотопический состав в пробах выдыхаемого воздуха с погрешностью  $\sim 0.1\%$  ( $0.1\% - 0.01\%$ ). При стандартной распространенности  $^{13}\text{C}$  в природе  $\sim 1.1237\%$  [18], содержании  $\text{CO}_2$  в выдохе  $\sim 3\%$  и атмосферном давлении такая чувствительность изотопического анализа возможна при концентрационной чувствительности к молекулам  $\text{CO}_2$   $\sim 3 \cdot 10^{-6}\%$  объемных (0.03 ppm).

Для лазерного изотопического анализа состава выдыхаемого воздуха нами был использован спектральный диапазон вблизи  $2.05 \mu\text{m}$ . В этой области интерферируют *R*-ветвь полосы 20013–00001  $^{12}\text{CO}_2$  и *P*-ветвь полосы 20012–0001  $^{13}\text{CO}_2$  [19]. Благодаря этому можно выбрать удобную для анализа пару расположенных рядом линий  $^{12}\text{CO}_2$  и  $^{13}\text{CO}_2$ . Для газовой смеси, соответствующей составу выдыхаемого воздуха, коэффициент поглощения в максимуме наиболее интенсивных линий  $^{13}\text{CO}_2$  этой полосы составляет  $\sim 3 \cdot 10^{-5} \text{cm}^{-1}$ . При таком коэффициенте поглощения и чувствительности к поглощению на уровне  $3 \cdot 10^{-7}$ , которая достижима с помощью ПДЛ [11,12], необходимая концентрационная чувствительность может быть реализована при длине оптического пути  $\sim 100 \text{cm}$ . Дополнительным техническим требованием является объем исследуемой газовой пробы не более 100 ml, что обусловлено объемом контейнера для сбора образцов выдыхаемого воздуха.

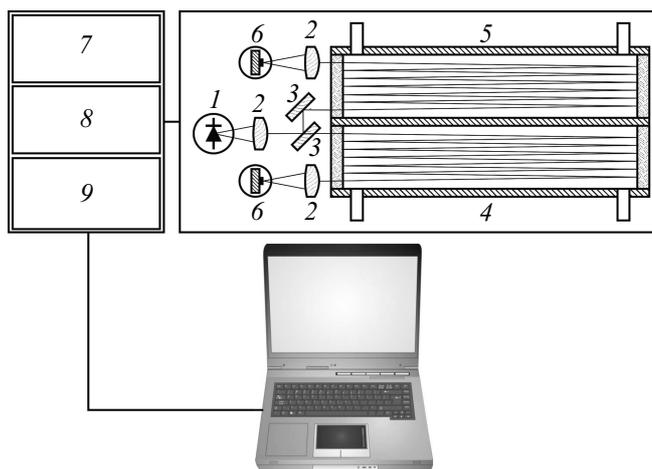
### 1.1. Лазерный анализатор изотопического состава

В разработанном нами лазерном анализаторе используется ПДЛ с распределенной обратной связью, работающий при комнатных температурах вблизи  $2.05 \mu\text{m}$  (Laser Components, Германия). Точная настройка оптической частоты лазера проводится за счет изменения его температуры в диапазоне от  $-10$  до  $+50^\circ\text{C}$  с помощью термоэлектрического охладителя. Для сканирования частоты используется импульсно-периодический режим накачки ПДЛ. Частота повторения импульсов составляла 200–300 Hz, а длительность импульсов генерации — 3–4 ms. Для накачки лазера применялись

импульсы тока с линейным нарастанием амплитуды, что позволяло линеаризовать скорость перестройки частоты в течение импульса. В таком режиме скорость перестройки лазера составляла  $\sim 2 \text{ cm}^{-1}/\text{ms}$ , а в течение импульса генерации лазер перестраивался на  $5\text{--}8 \text{ cm}^{-1}$ . Средняя мощность лазерного излучения оценивалась величиной  $\sim 0.5 \text{ mW}$ . Средняя температура ПДЛ стабилизировалась с погрешностью  $\sim 10^{-3} \text{ }^\circ\text{C}$ . Такая точность стабилизации температуры возможна за счет близкого размещения миниатюрного лазерного кристалла и датчика температуры на термоэлектрическом охладителе внутри единого корпуса лазера. При этом используются цифровые методы регулирования заданной температуры. Это наряду с высокой воспроизводимостью параметров токовой накачки (воспроизводимость временных параметров на уровне  $10^{-8}$ , воспроизводимость амплитудных характеристик на уровне  $10^{-6}$ ), которая достигается за счет использования цифровых методов формирования импульсов тока, обеспечивало необходимую воспроизводимость частотной перестройки (лучше  $10^{-3} \text{ cm}^{-1}$ ), амплитуды излучения (лучше  $10^{-3}$ ) и регистрируемых спектров пропускания.

Особенности оптической схемы спектрофотометра (рис. 1) позволяют обеспечить достаточную величину поглощения в аналитических линиях, одновременный анализ референсной (базальной) и анализируемой (контрольной) газовых смесей, близкую интенсивность лазерного излучения и равенство температур газа в двух оптических каналах. Выходящий из лазерного кристалла луч коллимируется в параллельный пучок с помощью асферической линзы с фокусным расстоянием  $\sim 8 \text{ mm}$ . С помощью делительного зеркала луч расщепляется на два пучка близкой интенсивности. Далее каждый из лучей пропускается через одну из идентичных по конструкции многоходовых кювет. Длина кювет составляет  $\sim 200 \text{ mm}$ . При 14 проходах луча в каждой кювете длина оптического пути в кюветах составляет  $\sim 280 \text{ cm}$ . После выхода из кювет лазерное излучение фокусируется на охлаждаемые до  $-50^\circ\text{C}$  фотоприемники типа InGaAs компании „Hamamatsu“. Внутренний объем каждой кюветы составлял около  $50 \text{ cm}^3$ . Каждая кювета снабжена патрубками для прокачки газа.

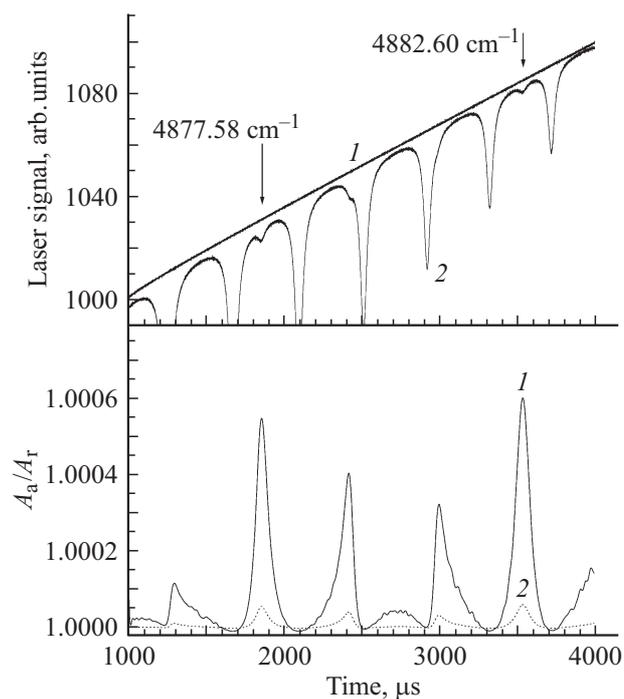
Работа спектрофотометра базируется на использовании специально разработанного нами программно-аппаратного комплекса, который состоит из 3 цифровых блоков: стабилизации температуры ПДЛ, накачки ПДЛ и регистрации спектров пропускания. Схема блока управления и регистрации основана на использовании программируемых логических матриц компании „Altera“ и быстродействующих высокозарядных АЦП компании „Texas Instruments“. Частота оцифровки лазерного сигнала составляет  $5 \text{ MHz}$ , дискретность —  $16 \text{ bit}$ . Этот блок обеспечивает одновременную и независимую регистрацию лазерных спектров в двух оптических каналах. Высокая скорость оцифровки сигнала и обмена данными между системой регистрации и управляющим компьютером, осуществляемого по протоколу USB 2.0, позволяет



**Рис. 1.** Схема лазерного анализатора изотопического состава  $\text{CO}_2$  в выдыхаемом воздухе. 1 — перестраиваемый диодный лазер, 2 — асферические микролинзы, 3 — зеркала, 4 — референсная кювета, 5 — аналитическая кювета, 6 — фотоприемники, 7 — стабилизатор температуры ПДЛ, 8 — источник тока накачки ПДЛ, 9 — блок регистрации лазерных спектров.

регистировать с временным разрешением  $0.2 \mu\text{s}$ , без пропусков все лазерные импульсы и соответственно исследуемые спектры пропускания в двух регистрирующих каналах одновременно. С помощью программного обеспечения управляющего ПК, работающего под ОС WindowsXP/Vista, осуществляется визуализация терминала управления системой, управление комплексом, введение и установка параметров системы, выбор алгоритмов обработки спектральных данных, визуализация регистрируемых спектров в режиме реального времени и визуализация результатов обработки спектральных данных.

Сравнительный изотопический анализ проб выдыхаемого воздуха осуществляется следующим образом. С помощью ПДЛ сканируется выбранный спектральный участок протяженностью от 2 до  $10 \text{ cm}^{-1}$ , в который попадают линии поглощения как  $^{12}\text{CO}_2$ , так и  $^{13}\text{CO}_2$ . Используются два идентичных оптических канала, включающих многоходовые кюветы с близкой длиной оптического пути. Первый канал используется для регистрации спектров пропускания референсной газовой смеси, второй — анализируемой. Конструкция кювет обеспечивает одинаковую (с точностью до  $0.01^\circ$ ) температуру газовых смесей в обоих каналах. При проведении анализа обе кюветы предварительно продуваются газообразным азотом и производится одновременная регистрация спектров пропускания „пустой“ референсной и „пустой“ аналитической кювет. Затем в референсную кювету напускается референсная газовая смесь (базальная проба выдоха), а в аналитическую — анализируемая (контрольная проба выдоха) и производится одновременная регистрация их спектров пропускания. Далее производится обработка зарегистрированных спектров по процедуре, описываемой ниже.



**Рис. 2.** Вверху — экспериментальные лазерные спектры пустой аналитической кюветы (1) и аналитической кюветы, наполненной пробой выдыхаемого воздуха (2), в спектральном диапазоне 4873–4885  $\text{cm}^{-1}$ . Внизу — экспериментальный спектр отношения  $A_a/A_r$  для двух проб выдыхаемого воздуха с измеренной разностью содержания  $^{12}\text{CO}_2$  и  $^{13}\text{CO}_2$  0.9% (1) и рассчитанный спектр отношения  $A_a/A_r$  для  $\Delta\delta^{13}\text{C}$  0.1% (2).

На рис. 2 представлены экспериментальные спектры пропускания, полученные с помощью описанного выше спектрофотометра. В верхней части рисунка показаны фрагменты спектра пропускания „пустой“ референсной кюветы и базальной пробы выдыхаемого воздуха, отобранной у обследуемого испытуемого до принятия мочевины  $^{13}\text{C}$ . Как видно, в течение импульса длительностью  $\sim 4$  ms регистрировался спектр протяженностью около 8  $\text{cm}^{-1}$ , от 4875 до 4883  $\text{cm}^{-1}$ . В этот участок попадает несколько линий  $^{12}\text{CO}_2$  и две линии  $^{13}\text{CO}_2$ , удобные для проведения изотопического анализа. Поглощение в линиях  $^{13}\text{CO}_2$  составляет  $\sim 0.5\%$ . В аналитическом канале были зарегистрированы аналогичные спектры пропускания контрольной (анализируемой) пробы выдыхаемого воздуха, отбираемой у пациента через 20 min после принятия меченой мочевины. Эти спектры очень незначительно отличаются от спектров, полученных в референсном канале, и потому не показаны на рисунке.

Для изотопического анализа используется 1000 накоплений регистрируемых спектров пропускания (время измерения спектров составляет  $\sim 10$  s), при этом отношение сигнал/шум составляет  $\sim 10^4$ . Эта величина определяется в основном уровнем дробовых шумов предусилителя и фотопремножителя. Дополнительное использование цифровой фильтрации этих случайных

шумов, основанной на преобразовании Фурье, позволяет повысить отношение сигнал/шум регистрации резонансного поглощения на фоне случайных шумов до требуемых  $\sim 2 \cdot 10^6$ . При этом немаловажную роль при регистрации слабого резонансного поглощения играет уменьшение уровня воспроизводимых помех (модуляции спектра интерференционной природы, поглощение в открытой атмосфере), которое обеспечивалось за счет нормировки спектров пропускания в каждом канале на спектры „пустых“ кювет. Отметим, что давление и температура всех используемых газовых сред были одинаковыми и соответствовали условиям лаборатории, где проводились измерения. Поэтому смена газовых сред в кюветах не приводила к заметным изменениям оптических параметров системы.

В нижней части рис. 2 показан результат обработки контрольного и референсного спектров поглощения, в ходе которой рассчитывается их отношение  $A_a/A_r$ . Амплитуда резонансных особенностей, соответствующих линиям  $^{13}\text{CO}_2$ , которые расположены вблизи 4877.58 и 4882.6  $\text{cm}^{-1}$ , на данном рисунке соответствует разности изотопического состава базальной и контрольной проб выдыхаемого воздуха  $\sim 0.9\%$ . Анализ изотопического отношения в этих же пробах выдыхаемого воздуха с помощью неселективного ИК анализатора UVI 200 фирмы Photal, Япония, имеющего точность измерений по техническому паспорту 0.7%, дал значение  $\sim 1.2\%$ , что демонстрирует неплохое совпадение результатов, получаемых приборами, основанными на использовании различных физических принципов. Воспроизводимость полученного значения по результатам пяти измерений характеризуется стандартным отклонением, составившим 0.037%.

Для оценки чувствительности разработанного нами подхода на рис. 2 также представлен спектр отношения  $A_a/A_r$ , рассчитанный для разности изотопического состава 0.1%. Сопоставление экспериментального и рассчитанного спектров позволяет оценить уровень достигнутой чувствительности величиной менее 0.1%. Этот уровень определяется температурной нестабильностью геометрии оптической схемы спектрофотометра, приводящей к медленным и плохо воспроизводимым вариациям огибающей лазерного спектра в обоих оптических каналах.

## 1.2. Материалы и методы клинических исследований

### Характеристика больных

Исследование, состоявшее из нескольких циклов, проводилось на базе поликлинического, общетерапевтического и гастроэнтерологического отделений Клиники пропедевтики внутренних болезней, гастроэнтерологии, гепатологии им. В.Х. Василенко Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова. Было обследовано 309 пациентов, страдающих хроническим гастритом (111), гастродуоденитом (17), эрозивным гастри-

том (40), эрозивным дуоденитом (24), язвенной болезнью желудка (29) и ДПК (88). Их возраст составил от 15 до 79 лет (средний возраст  $42.4 \pm 14.57$  лет), среди них было 155 мужчин и 154 женщины.

### Методы обследования и диагностики

Обследование и диагностики пациентов, включенных в исследование, состояли из следующих этапов:

- оценка клинической картины заболевания,
- эзофагогастродуоденоскопия с парными биопсиями из тела желудка, антрального отдела желудка и ДПК,
- морфологическая оценка биоптатов на основании визуально-аналоговой шкалы,
- $^{13}\text{C}$ -УДТ, выполняемый в соответствии с протоколом, рекомендованным Европейским Стандартом.

Диагностика для большинства пациентов, участвовавших в исследовании, проводилась до терапии и через 4–6 недель после отмены всех препаратов, использовавшихся в терапии.

При проведении гистологических исследований для оценки состояния слизистой использовалась модифицированная Сиднейская система (Хьюстон, 1994 г.), которая подразумевает следующие критерии: топография, степень выраженности воспаления, активность гастрита, морфологический вариант гастрита, стадия атрофии, наличие метаплазии эпителия, а также наличие обсемененности (колонизация) *H. pylori* [cite13]. Полуколичественная оценка морфологических изменений проводилась по 4-бальной шкале (от 0 до 3+).

### Терапия

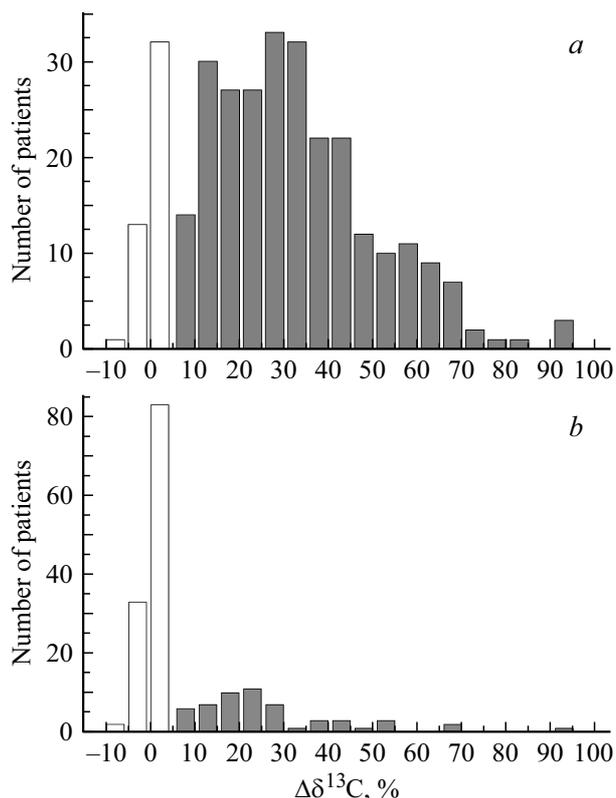
В данном исследовании использовались различные схемы лечения, направленные на эрадикацию *H. pylori* и основанные на применении ингибиторов протонной помпы. Примененные схемы лечения включали ранитидин висмут цитрат (пилорид) в комбинациях с различными антибиотиками (кларитромицин, амоксициллин, фуразолидон) и метронидазолом.

## 2. Результаты и обсуждение

### 2.1. Инфицированность *H. pylori* при заболеваниях гастродуоденальной зоны

#### Результаты лазерного $^{13}\text{C}$ -УДТ до и после терапии

В соответствии с протоколом исследования лазерный  $^{13}\text{C}$ -УДТ был проведен пациентам для первичной диагностики инфицированности бактерией *H. pylori*, а также с целью дальнейшей оценки эффективности антигеликобактерной терапии. До назначения лечения 309 пациентов с диспепсическими жалобами прошли первичный дыхательный тест.



**Рис. 3.** Распределение значений  $^{13}\text{C}$ -УДТ до и после прохождения эрадикационной терапии: *a* — до лечения,  $N = 309$  человек; *b* — после лечения,  $N = 151$  человек. Светлые столбцы — *H. pylori*-отрицательные результаты, темные столбцы — *H. pylori*-положительные.

Как видно из рис. 3, *a*, при первичной диагностике все пациенты, согласно результатам  $^{13}\text{C}$ -УДТ, распределились на две группы: *H. pylori*-негативные (46 человек) и *H. pylori*-позитивные (263 человека), пустые и закрашенные столбцы соответственно. Неинфицированные больные имели значения  $\Delta\delta^{13}\text{C}$  менее 5%, их количество составило  $\sim 15\%$  от общего числа. Для инфицированных пациентов наблюдалось близкое к нормальному распределение значений  $\Delta\delta^{13}\text{C}$  с максимумом вблизи 30%. Около половины обследованных пациентов имело значение  $\Delta\delta^{13}\text{C}$  в диапазоне от 15 до 40%. Максимально наблюдаемое значение  $\Delta\delta^{13}\text{C}$  составило  $\sim 102\%$ .

Инфицированным пациентам методом слепой рандомизации были назначены различные схемы антигеликобактерной терапии. Схемы лечения отличались типом применяемых антисекреторных препаратов и антибиотиков. Неинфицированным пациентам с диспепсическим и болевым синдромом назначалась терапия другого типа, адекватная их заболеванию, поэтому в анализ эффективности лечения они не включались. Проведение исследований  $^{13}\text{C}$ -УДТ до терапии и через 4–6 недель после нее позволило сравнить эффективность примененных медикаментозных схем лечения.

На рис. 3, *b* представлено распределение результатов  $^{13}\text{C}$ -УДТ для пациентов, прошедших антигеликобактер-

ную терапию (151 человек), через 4–6 недели после лечения. Из рисунка следует, что для большей части пациентов (~ 80%) проведенная терапия оказалась успешной — инфекция *H. pylori* была уничтожена. Однако у остальных значения  $\Delta\delta^{13}\text{C}$  превышали 5% и составляли от 9 до 95%, что соответствует позитивному *H. pylori*-статусу. Более детальный анализ эффективности использованных схем терапии будет приведен ниже.

### Возрастное распределение результатов $^{13}\text{C}$ -УДТ

На рис. 4 показана зависимость показателей дыхательного теста от возраста для *H. pylori*-инфицированных пациентов. Как следует из рисунка, наблюдается постепенное нарастание средней величины инфицированности *H. pylori* в возрастных группах от 15 до 34 лет. В четырех старших возрастных группах (от 60 лет) можно отметить тенденцию к снижению средних значений  $\Delta\delta^{13}\text{C}$ , которая, однако, при имеющемся количестве данных не является достаточно достоверной статистически ( $p > 0.05$ ). Данный вид распределения, свидетельствующий о росте инфицированности с возрастом в возрастных группах от 15 до 34 лет, косвенно подтверждает участие *H. pylori* в развитии гастродуоденальной патологии. Снижение инфицированности *H. pylori* в старших возрастных группах можно трактовать как следствие развития атрофических изменений в гастродуоденальной слизистой, приводящих к ухудшению условий для ее колонизации бактериями данного типа.

## 2.2. Сопоставление результатов различных методов диагностики

### Сравнение данных $^{13}\text{C}$ -УДТ с результатами гистологических исследований

Актуальность сопоставления данных, получаемых в результате лазерного  $^{13}\text{C}$ -УДТ, с результатами гистологического исследования у пациентов, страдающих *H. pylori*-ассоциированными заболеваниями желудка и ДПК, обусловлена целым рядом причин. Среди них как существенные методические особенности данных видов диагностики, так и принципиальные отличия объектов наблюдения. Во-первых, в отличие от гистологического исследования УДТ не является прямым методом обнаружения *H. pylori*. Фактически при применении УДТ о колонии этих бактерий судят по активности выработки ими фермента уреазы. Во-вторых, УДТ дает информацию интегрально и усреднено по всему желудку, и его результат не зависит от топографии колонии *H. pylori* на гастродуоденальной слизистой, в то время как при гистологическом исследовании используются локальные биопсии. Кроме того, при получении существенно различающихся результатов в различных образцах биоптатов возникает проблема корректного усреднения данных. В-третьих, гистологическая оценка

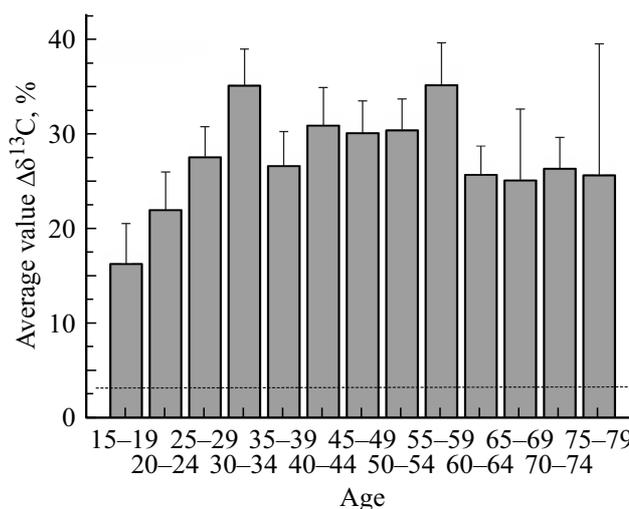
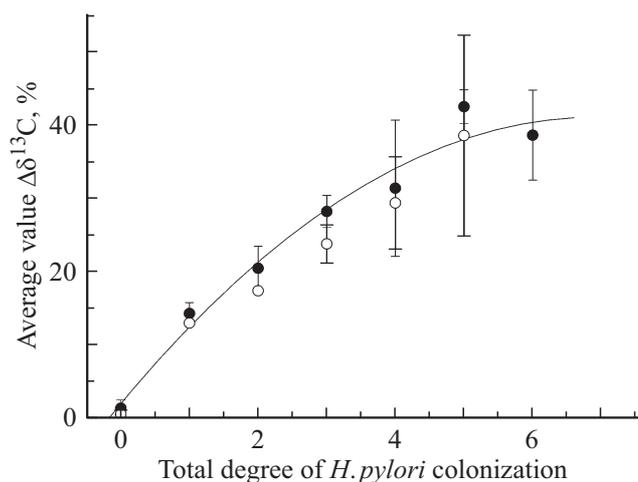


Рис. 4. Распределение значений  $^{13}\text{C}$ -УДТ по возрасту, статистика по 309 тестам.

проводится с применением достаточно грубой дискретной (всего 4 градации) визуально-аналоговой шкалы. При интерпретации результатов гистологического исследования возможна неоднозначность оценки, которая может быть обусловлена квалификацией, опытом и особенностями субъективного восприятия проводящего анализ специалиста. В этом случае трудно говорить о корректной количественной оценке размера колонии *H. pylori*. Результатами УДТ является непрерывный ряд значений, определяемых инструментально и объективно отражающих степень колонизации, которая выражается количественно. Поскольку воспаление гастродуоденальной слизистой, ассоциированное с *H. pylori*, независимо от локализации бактерий коррелирует с результатами дыхательного теста, то УДТ в данном случае может отражать взаимосвязь между колонизацией и параметрами воспалительного процесса. Таким образом, сопоставление данных  $^{13}\text{C}$ -УДТ и гистологического исследования позволяет установить взаимосвязь между уреазной активностью колонии *H. pylori* и выраженностью изменений слизистой оболочки при хроническом гастрите и язвенной болезни. Кроме того, это может указать на дополнительные диагностические возможности неинвазивной диагностики, основанной на дыхательных тестах.

В связи с тем, что дыхательный тест дает усредненную и интегральную по желудку и ДПК информацию о колонии *H. pylori*, для сопоставления результатов лазерного  $^{13}\text{C}$ -УДТ и гистологии было впервые предложено использовать суммарные значения результатов гистологического анализа биоптатов, поскольку такое сопоставление более адекватно учитывает возможности сравниваемых методов. Таким образом, в данном исследовании получаемое значение  $\delta^{13}\text{C}$  сравнивалось с арифметической суммой каждого гистологического параметра (например, колонизации или активности вос-



**Рис. 5.** Средние значения  $^{13}\text{C}$ -УДТ в зависимости от суммарной степени колонизации *H. pylori* в теле желудка, антральном отделе и ДПК до (●) и после (○) лечения.

паления) по телу желудка, антральному отделу желудка и ДПК.

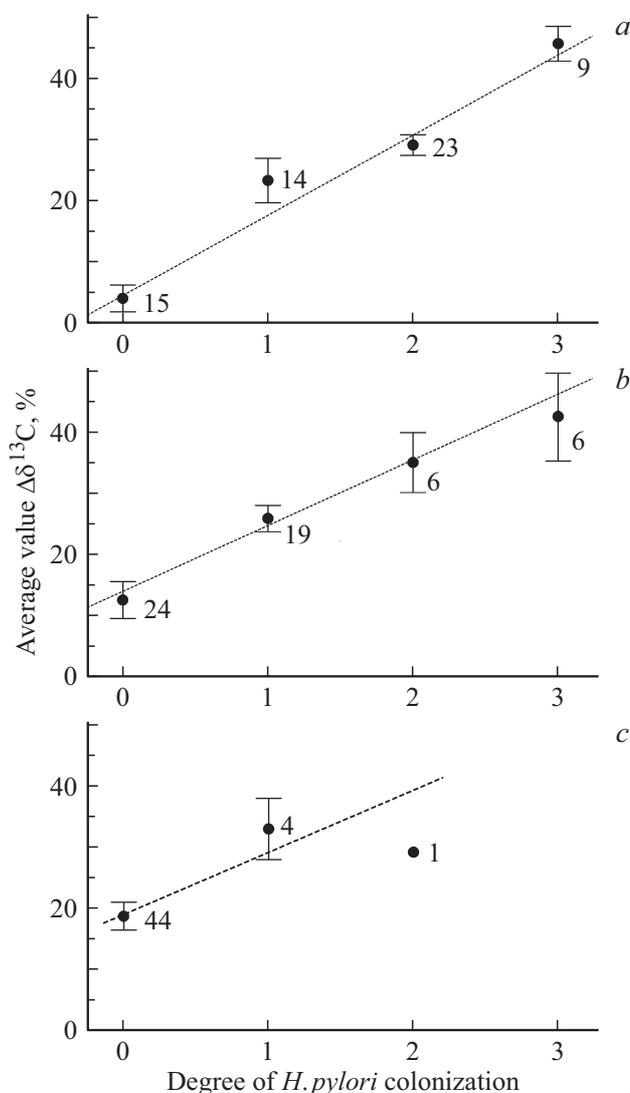
#### Сравнение данных $^{13}\text{C}$ -УДТ и морфологической оценки степени колонизации

На рис. 5 представлена зависимость средних значений  $\Delta\delta^{13}\text{C}$ , полученных до и после лечения, от суммарной степени колонизации *H. pylori* слизистой тела желудка, антрального отдела и ДПК. Видна монотонная зависимость результатов дыхательного теста от гистологической оценки степени колонизации биоптатов. При низких и средних значениях обсемененности наблюдается близкая к линейной зависимость. Интерполяционная кривая, проведенная через экспериментально полученные точки, пересекает ось ординат вблизи нулевых значений  $\Delta\delta^{13}\text{C}$ . Последнее соответствует очевидному факту: „нет бактерий *H. pylori* — нет уреазной активности“. Отметим, что наклон кривой при низких значениях колонизации составляет  $\sim 13\%/scale\ unit$ . При высоких значениях колонизации наблюдается снижение скорости роста кривой, которое можно объяснить более интенсивным расходом субстрата ( $^{13}\text{C}$ -мочевины) и его истощением к моменту выполнения контрольного теста на 30-й min в присутствии большого количества бактерий *H. pylori*.

Таким образом, несмотря на то, что сравниваются огрубленные за счет усреднения по группам результаты, полученное соответствие данных прямого и косвенного определения количества бактерий говорит о правомерности количественной оценки степени колонизации слизистой бактерией *H. pylori* на основании результатов лазерного  $^{13}\text{C}$ -УДТ.

Наряду с проведенным выше сопоставлением интегральных данных представляет интерес также сравнение результатов  $^{13}\text{C}$ -УДТ и гистологии дифференцированно

по топографическим отделам. Значения  $\Delta\delta^{13}\text{C}$ , усредненные по группам пациентов с одинаковой степенью обсемененности слизистой в различных отделах, представлены на рис. 6, *a* для антрального отдела, на рис. 6, *b* — для тела желудка и на рис. 6, *c* — для ДПК. Из графика на рис. 6, *a* видно, что в антральном отделе также наблюдается монотонное, близкое к линейному, возрастание результатов  $^{13}\text{C}$ -УДТ с ростом степени колонизации. Наклон интерполяционной прямой составляет  $\sim 13\%/scale\ unit$ , уровень пересечения этой прямой с осью ординат близок к нулевым значениям  $\Delta\delta^{13}\text{C} \sim 4\%$ . Для данных по телу желудка, рис. 6, *b*, также характерен близкий к линейному рост значений  $^{13}\text{C}$ -УДТ с нарастанием степени колонизации. Наклон интерполяционной прямой в этом случае составляет  $\sim 11\%/scale\ unit$ , а уровень пересечения с осью ординат существенно выше,



**Рис. 6.** Средние значения  $^{13}\text{C}$ -УДТ в зависимости от степени колонизации *H. pylori* в антральном отделе желудка (*a*), в теле желудка (*b*), в ДПК (*c*). Цифрами указано количество пациентов в группах с одинаковым результатом гистологического теста.

чем для антрального отдела,  $\sim 14\%$ . Для ДПК наклон интерполяционной прямой, наилучшим образом описывающий экспериментальные точки (рис. 6, *c*), также составляет около 13% scale unit, в то время как уровень пересечения с осью ординат находится вблизи  $\sim 18\%$ . Таким образом, наклоны интерполяционных прямых для различных отделов, а также наклон интерполяционной кривой для суммарной оценки на рис. 5 при низких степенях колонизации близки по величине и составляют 11–13% scale unit. Такое совпадение закономерно, поскольку отражает специфику гистологической оценки колонизации, которая основана на подсчете количества бактерий в поле зрения микроскопа при исследовании множественных биоптатов гастродуоденальной слизистой. Таким образом, оценка морфолога, несмотря на ее дискретность, при достаточно большой статистической выборке оказывается с достаточной точностью пропорциональной концентрации бактерий в биоптате независимо от того, откуда забирается образец ткани. В то же время уровни пересечения интерполяционных прямыми оси ординат на рис. 6 существенно изменяются в зависимости от топографии. Это можно объяснить тем, что вклад бактерий, располагающихся в разных отделах гастродуоденальной зоны, в значение дыхательного теста различен.

#### Данные лазерного $^{13}\text{C}$ -УДТ и морфологическая оценка параметров воспаления

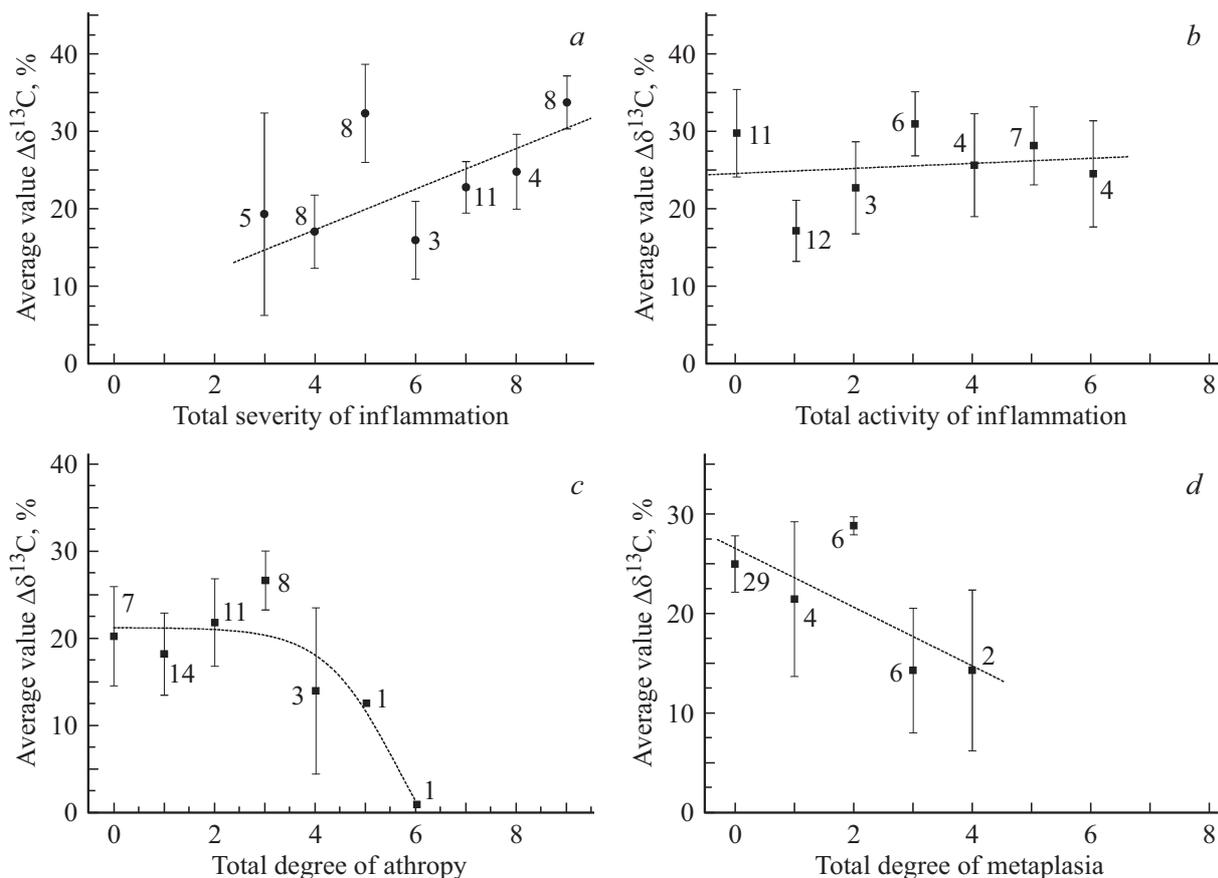
Наряду со сравнением результатов  $^{13}\text{C}$ -УДТ с гистологической оценкой колонизации, между которыми очевидно наличие прямой связи, представляет интерес также их сопоставление с параметрами воспалительного процесса, который обусловлен присутствием инфекции. Однако наличие взаимосвязи параметров воспаления (выраженности и активности), определяемых гистологически, с количеством бактерий *H. pylori* в гастродуоденальной зоне не столь очевидно, поскольку процесс воспаления может иметь сложную картину, зависящую от множества факторов, таких как патогенность бактерий, степень иммунного ответа организма человека, степени его хронизации или остроты и других.

Для подобного сопоставления продуктивным также может оказаться сравнение результатов лазерного  $^{13}\text{C}$ -УДТ с суммарной по рассматриваемым отделам гастродуоденальной зоны оценкой таких параметров воспаления слизистой, как выраженность и активность, характеризующие хронизацию и остроту воспалительного процесса соответственно. В данном исследовании такой анализ был проведен по массиву данных, полученных в результате первичного обследования *H. pylori*-позитивных пациентов. На рис. 7, *a* представлена зависимость средних значений дыхательного теста от суммарной по телу желудка, антральному отделу и ДПК оценки выраженности воспаления, а на рис. 7, *b* сопоставлены результаты  $^{13}\text{C}$ -УДТ и суммарной оценки активности воспаления.

Как видно на рис. 7, *a*, усредненные значения  $\Delta\delta^{13}\text{C}$  (т.е. по сути суммарная колонизация слизистой) достаточно сильно коррелируют со степенью выраженности мононуклеарной инфильтрации, т.е. чем выше оценка выраженности воспаления (сильнее хронизация воспалительного процесса), тем больше значение дыхательного теста. Отметим, что у инфицированных пациентов, участвовавших в данном исследовании, отсутствовали суммарные оценки выраженности воспаления ниже 3 баллов. Это означает, что при наличии инфекции *H. pylori* в гастродуоденальной зоне как минимум в одном из отделов будет наблюдаться мононуклеарная инфильтрация, что еще раз подтверждает справедливость положения об ассоциировании хронического воспалительного процесса в желудке и ДПК с наличием инфекции *H. pylori*. При этом у десяти *H. pylori*-негативных пациентов, отсутствие инфекции у которых было подтверждено обоими методами, сохранялась слабая и умеренная мононуклеарная инфильтрация слизистой оболочки гастродуоденальной зоны, что могло быть связано с другими причинами хронического воспаления, в том числе аутоиммунной природы.

При сопоставлении усредненных значений  $^{13}\text{C}$ -УДТ с суммарной оценкой активности воспаления (рис. 7, *b*) не прослеживается четкой корреляции между сравниваемыми параметрами, т.е. среднее значение дыхательного теста не зависит от суммарной оценки степени нейтрофильной инфильтрации гастродуоденальной слизистой (и таким образом от остроты воспалительного процесса). Этот факт, в частности, можно связать с различной длительностью персистенции инфекции *H. pylori* у обследованных пациентов, а также с отсутствием у части из них активных гистологических признаков острого воспаления. Не исключено также, что часть пациентов имела штаммы *H. pylori* с незначительно выраженными патогенными свойствами, не вызывающими морфологических изменений слизистой, соответствующих активному воспалению. У большинства *H. pylori*-позитивных пациентов, как видно из рис. 7, *b*, преобладали минимальные гистологические признаки активности воспаления, а у десяти *H. pylori*-негативных пациентов нейтрофилы в слизистой оболочке в большинстве случаев отсутствовали.

Еще одним сравниваемым параметром в данном исследовании была суммарная оценка атрофии гастродуоденальной слизистой. Результат сопоставления этого параметра со средними значениями  $^{13}\text{C}$ -УДТ показан на рис. 7, *c*. Как видно, результат дыхательного теста слабо зависит от степени атрофии при низких ее значениях. При нарастании атрофических изменений слизистой наблюдается тенденция к снижению показателей дыхательного теста. Хотя данный вывод не является надежным в связи с небольшой выборкой данных по пациентам с выраженной атрофией. Однако монотонное убывание значений УДТ с ростом стадии атрофии хорошо согласуется с известным фактом, что бактерии



**Рис. 7.** Средние значения  $^{13}\text{C}$ -УДТ при различных значениях суммарной оценки выраженности воспаления слизистой (а), активности воспаления гастродуоденальной слизистой (б), атрофии гастродуоденальной слизистой (с), метаплазии гастродуоденальной слизистой (д). Цифрами указано количество пациентов в группах с одинаковой суммарной оценкой метаплазии.

*H. pylori*, как правило, не заселяют атрофированную слизистую.

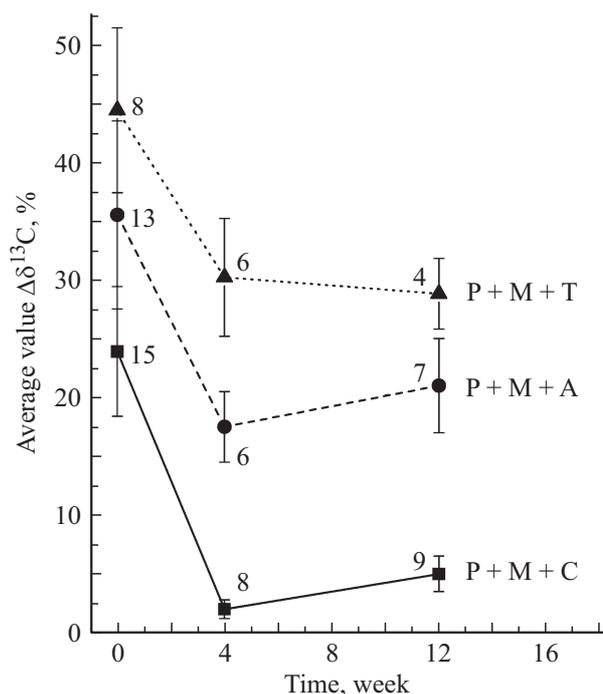
Результат сопоставления показателей дыхательного теста с гистологическими признаками степени метаплазии слизистой желудка и ДПК показан на рис. 7, д. Видно, что рост степени метаплазии сопровождается монотонным снижением результатов  $^{13}\text{C}$ -УДТ. Такую закономерность можно объяснить тем, что такие изменения морфологической структуры тканей приводят к уменьшению области гастродуоденальной слизистой, пригодной для заселения бактериями *H. pylori*. Это в свою очередь ведет к уменьшению размера колонии бактерий в ЖКТ.

### 2.3. Применение лазерного $^{13}\text{C}$ -УДТ в оценке и сравнении эффективности схем эрадикационной терапии

В рамках данного исследования была проведена апробация лазерного  $^{13}\text{C}$ -УДТ применительно к оценке и сравнению эффективности различных схем эрадикационной терапии при хроническом гастрите и язвенной болезни желудка и ДПК. В одном из циклов клинических исследований все участвовавшие в эксперименте

пациенты проходили курс однонедельной тройной эрадикационной терапии, основанной на применении комбинированного антисекреторного препарата, содержащего висмут (пилорид), метронидазола и антибактериального препарата. Схемы лечения отличались типом применяемого антибиотика — использовались амоксициллин, тетрациклин или кларитромицин. Для сравнения эффективности примененных медикаментозных схем лечения диагностика пациентов с использованием лазерного  $^{13}\text{C}$ -УДТ была проведена до терапии, через 4 недели и через 12 недель после курса терапии.

На рис. 8 показана динамика значений  $\Delta\delta^{13}\text{C}$ , усредненных по группам пациентов, наблюдавшаяся после применения трех схем терапии, упомянутых выше. Видно, что все три схемы дают уменьшение средних значений  $^{13}\text{C}$ -УДТ на четвертую неделю после лечения. Наиболее ярко выраженный результат наблюдается при применении схемы, содержащей кларитромицин (P + M + C). Среднее значение  $\Delta\delta^{13}\text{C}$  в группе уменьшилось с 24 до 2%. Остальные две схемы оказались менее эффективными. К двенадцатой неделе для всех схем терапии наблюдается увеличение средних значений  $\Delta\delta^{13}\text{C}$ , что обусловлено частичным восстановлением колонии *H. pylori* у пациентов, для которых проведенная терапия



**Рис. 8.** Изменение со временем средних значений лазерного  $^{13}\text{C}$ -УДТ у пациентов, прошедших эрадикационную антигеликобактерную терапию с использованием различных схем лечения: P + M + T — пилорид + метронидазол + тетрациклин, P + M + A — пилорид + метронидазол + амоксициллин, P + M + C — пилорид + метронидазол + кларитромицин. Цифрами указано количество пациентов в обследованных группах.

оказалась недостаточно эффективной. Судя по данным 12-й недели, ни одна из этих схем, содержащих метронидазол, не обладает 100%-й эффективностью эрадикации, при этом применение схем, содержащих тетрациклин и амоксициллин, оказалось наименее эффективно.

### 3. Заключение

Таким образом, разработанный нами лазерный спектрофотометр, предназначенный для высокоточного сравнительного анализа содержания изотопомеров  $^{12}\text{CO}_2$  и  $^{13}\text{CO}_2$  в пробах выдыхаемого воздуха и основанный на использовании перестраиваемых диодных лазеров ближнего ИК диапазона ( $2.05\ \mu\text{m}$ ), был применен для диагностики *H. pylori*-ассоциированных заболеваний органов пищеварения. Спектрофотометр базируется на использовании двухканальной оптической схемы, многоходовых кювет малого объема и специализированной полностью цифровой системы управления. Для спектрального анализа была использована область вблизи  $4882\ \text{cm}^{-1}$ . Показано, что чувствительность к резонансному поглощению  $\sim 10^{-7}$  при оптической плотности в максимумах поглощения аналитических линий  $\sim 10^{-2}$  позволяет достичь чувствительности изотопического анализа  $\sim 0.1\%$ .

Была проведена клиническая апробация разработанной лазерной системы. Полученные в проведенных ис-

следованиях результаты позволяют сделать несколько важных выводов, касающихся специфики колонизации ЖКТ бактерией *H. pylori* при ряде гастроэнтерологических заболеваний и эффективности применяемых схем терапии.

Распределение результатов лазерного  $^{13}\text{C}$ -УДТ у пациентов с диспепсическими жалобами и болевым синдромом, полученные до и после эрадикационной терапии, отражают эпидемиологию заболеваний гастродуоденальной зоны, распространенность инфекцией *H. pylori* и закономерности колонизации ею ЖКТ, а также эффективность действия терапии и особенности восстановления колонии бактерий при неудачной терапии.

Возрастное распределение, указывающее на статистическое нарастание колонизации ЖКТ к среднему возрасту и ее уменьшение по мере старения организма, подтверждает участие *H. pylori* в развитии гастродуоденальной патологии и отражает возрастное развитие атрофических изменений в слизистой.

Для установления взаимосвязи между уреазной активностью колонии *H. pylori* и морфологическими изменениями слизистой оболочки при хроническом гастрите и язвенной болезни, которое становится возможным при сопоставлении данных  $^{13}\text{C}$ -УДТ и гистологического исследования, нами было впервые предложено использовать суммарные значения результатов гистологического анализа биоптатов, отбираемых из различных отделов гастродуоденальной зоны. Это позволяет учесть специфику обоих диагностических методов, заключающуюся в том, что дыхательный тест дает усредненную и интегральную по всей гастродуоденальной зоне информацию о колонии *H. pylori*, а анализ с помощью ЭГДС носит локальный характер. Показано, что при таком подходе за счет достаточно большой статистической выборки оценка колонизации слизистой морфологом, несмотря на ее дискретность, оказывается с достаточной точностью пропорциональной концентрации бактерий в биоптате, независимо от того, откуда забирается образец ткани.

При сравнении данных гистологического исследования и усредненных значений  $\Delta\delta^{13}\text{C}$ , получаемых при проведении лазерного  $^{13}\text{C}$ -УДТ, последние проявляют близкую к линейной зависимость от гистологической оценки колонизации как в каждом из топографических отделов гастродуоденальной зоны, так и от суммарной колонизации. Это позволяет выявить специфику топографии заселения слизистой, т.е. вклад различных отделов в результат дыхательного теста, при различных нозологических формах.

При сопоставлении данных лазерного  $^{13}\text{C}$ -УДТ с оценкой параметров воспаления выявлено, что чем выше оценка выраженности воспаления (т.е. сильнее хронизация воспалительного процесса), тем больше значение дыхательного теста. Это подтверждает справедливость положения об ассоциировании хронического воспалительного процесса в желудке и ДПК с наличием инфекции *H. pylori*. В то же время среднее значение дыхательного теста не зависит от суммарной оценки степени

нейтрофильной инфильтрации гастродуоденальной слизистой (и, таким образом, от остроты воспалительного процесса). Результат дыхательного теста также не зависит от степени атрофии при ее низких значениях. При нарастании атрофических изменений слизистой наблюдается тенденция к снижению показателей дыхательного теста, подтверждающая факт, что бактерии *H. pylori*, как правило, не заселяют атрофированную слизистую.

Установление факта инфицированности на основании данных лазерного  $^{13}\text{C}$ -УДТ по всем диагностическим характеристикам (чувствительность, точность, специфичность) очень близко к результатам гистологического исследования множественных биопсий как до терапии, так и после нее. Все определяемые параметры выше 90%.

Исследования показали высокую информативность использования лазерного  $^{13}\text{C}$ -УДТ в анализе результативности проводимой эрадикационной терапии. С помощью этого метода нами было проведено сравнение схем на основе ингибиторов протонной помпы, метронидазола и различных антибактериальных препаратов: амоксициллина, тетрациклина и кларитромицина. Полученная в исследовании эффективность схем эрадикации *H. pylori*, включавших ранитидин висмут цитрат (пилорид), омепразол (лосек, омез), рабепразол (париет) в комбинациях с различными антибиотиками (кларитромицин, амоксициллин, фуразолидон), составила от 80 до 100%. Для схем с применением метронидазола была получена существенно более низкая эффективность эрадикации — 53%.

## Соблюдение этических стандартов

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## Список литературы

- [1] Cooper D.E., Martinelli R.U., Carlisle C.B., Riris H., Bour D.B., Menna R.J. // *Appl. Opt.* 1993. V. 32. N 33. P. 6727. doi 10.1364/AO.32.006727
- [2] Stepanov E.V., Milyaev V.A., Selivanov Yu.G. // *Physics-Uspexhi.* 2000. V. 43. P. 417. doi 10.1070/PU2000v043n04ABEH000720
- [3] Stepanov E.V. // *Quant. Electron.* 2002. V. 32. N 11. P. 981. doi 10.1070/QE2002v032n11ABEH002332
- [4] Crosson E.R., Ricci K.N., Richman B.A., Chilese F.C., Owano T.G., Provencal R.A., Todd M.W., Glasser J., Kachanov A.A., Paldus B.A., Spence T.G., Zare R.N. // *Anal. Chem.* 2002. V. 74. N 9. P. 2003. doi 10.1021/ac025511d
- [5] Stepanov E.V. // *Quant. Electron.* 2006. V. 36. N 8. P. 731. doi 10.1070/QE2006v036n08ABEH013184
- [6] Stepanov E.V., Glushko A.N., Kasoev S.G., Koval A.V., Lapshin D.A. // *Quant. Electron.* 2011. V. 41. N 12. P. 1124. doi 10.1070/QE2011v041n12ABEH014698
- [7] Kerstel E., Gianfrani L. // *Appl. Phys. B.* 2008. V. 98. N 3. P. 439. doi 10.1007/s00340-008-3128-x
- [8] Modak A. // *J. Breath Research.* 2007. V. 1. N 1. P. 0140032007. doi 10.1088/1752-7155/1/1/014003
- [9] Boltin D., Levi Z., Perets T.T., Schmilovitz-Weiss H., Gingold-Belfer R., Dickman R.I., Dotan I. // *Gastroenterology Res. Pract.* 2018. V. 2018. AID. 5439539. P. 6. doi 10.1155/2018/5439539
- [10] Best L.M., Takwoingi Y., Siddique S., Selladurai A., Gandhi A., Low B., Yaghoobi M., Gurusamy K.S. // *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2018. V. 3. CD012080. doi 10.1002/14651858.CD012080.pub2
- [11] Gagliardi G., Castrillo A., Iannone R.Q., Kerstel E.R.T., Gianfrani L. // *Appl. Phys. B.* 2003. V. 77. N 1. P. 119. doi 10.1007/s00340-003-1240-5
- [12] Castrillo A., Casa G., Kerstel E., Gianfrani L. // *Appl. Phys. B.* 2005. V. 81. N 6. P. 863. doi 10.1007/s00340-005-1949-4
- [13] Malfertheiner P., Megraud F., O'Morain C.A., Gisbert J.P., Kuipers E.J., Axon A.T., Bazzoli F., Gasbarrini A., Atherton J., Graham D.Y., Hunt R., Moayyedi P., Rokkas T., Rugge M., Selgrad M., Suerbaum S., Sugano K., El-Omar E.M. // *Gut.* 2017. V. 66. N 1. P. 6–30. doi 10.1136/gutjnl-2016-312288
- [14] Chey W.D., Leontiadis G.I., Howden C.W., Moss S.F. // *Am. J. Gastroenterol.* 2017. V. 112. N 2. P. 212–239. doi 10.1038/ajg.2016.563
- [15] Boltin D., Kimchi N., Dickman R., Gingold-Belfer R., Niv Y., Birkenfeld S. // *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2016. V. 28. N 9. P. 1035–1040. doi 10.1097/MEG.0000000000000659
- [16] Kalkan I.H., Sapmaz F., Güliter S., Atasoy P. // *Wiener Klinische Wochenschrift.* 2016. V. 128. N 9–10. P. 329–334. doi 10.1007/s00508-015-0896-2
- [17] Eisdorfer I., Shalev V., Goren S., Chodick G., Muhsen K. // *Biol. Sex Diff.* 2018. V. 9. N 1. P. 1. doi 10.1186/s13293-017-0161-7
- [18] Физические величины. Справочник / Под ред. Григорьева И.С., Мейлихова Е.З. М.: Энергоатомиздат. С. 994, 1991. *Fisicheskie velichini, Spravochnik.* Ed. Grigor'ev I.S., Meilikhov E.Z., M.: Energoatomizdat. 1991. P. 994.
- [19] Rothman L.S., Jacquemart D., Barbe A., Chris B.D., Birk M., Brown L.R., Carleer M.R., Chackerian C., Chance Jr.K., Dana V., Devi V.M., Flaud J.-M., Gamache R.R., Goldman A., Hartmann J.-M., Jucks K.W., Maki A., GMandin J.-Y., Massie S.T., Orphal J., Perrin A., Rinsland C.P., Smith M.A.H., Tennyson J., Tolchenov R.N., Toth R.A., Vander A.J., Varanasi P., Wagner G. // *JQSRT.* 2005. V. 96. N 2. P. 139. doi 10.1016/j.jqsrt.2004.10.008