

Особенности патогенеза *Helicobacter pylori* инфекции у представителей хакасской популяции

Агеева Е. С.¹, Штыгашева О. В.^{1,2}, Рязанцева Н. В.³

The features of pathophysiology *Helicobacter pylori* associated ulcerative disease from the Khakassies

Ageyeva Ye. S., Shtygasheva O. V., Ryazntseva N. V.

¹ Хакасский государственный университет им. Н. Ф. Катанова, г. Абакан

² ГУЗ «Хакасская республиканская больница им. Г. Я. Ремизовской», г. Абакан

³ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Агеева Е. С., Штыгашева О. В., Рязанцева Н. В.

Исследование посвящено изучению особенностей патогенеза *Helicobacter pylori* (*HP*) ассоциированной язвенной болезни (ЯБ) у хакасов. Установлено, что по сравнению с европеоидами выраженная у монголоидов с ЯБ активация Т-клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа сопровождается высоким содержанием CD4⁺- и CD20⁺-лимфоцитов в слизистой оболочке желудка. Изменения, выявленные в периферической крови у больных ЯБ, характеризовались снижением численности CD4⁺- и CD8⁺-субпопуляций лимфоцитов по сравнению с их количеством у пациентов с хроническим гастритом. В пользу существования иммуногенетических закономерностей развития ЯБ свидетельствовала обнаруженная положительная взаимосвязь между генотипом AA-251 интерлейкина-8 и риском развития ЯБ у хакасов. Обсуждается целесообразность определения популяционных рисков и протективных генотипов развития *HP*-ассоциированной ЯБ у хакасов.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori* язвенная болезнь, хакасы, Th1/Th2-иммунный ответ, аллельный полиморфизм генов, интерлейкин-8.

Peculiarities of pathogenesis of *Helicobacter pylori* (*HP*) associated gastric ulcer (GU) in Khakassies are investigated. It is found that, in contrast to Caucasians, the activation of the T-cell and humoral parts of the immune response in Mongoloids with GU is accompanied by the high content of CD4⁺- and CD20⁺-lymphocytes in the mucous coat of stomach. Changes revealed in the peripheral blood in GU patients were characterized by a decrease in the magnitude of CD4⁺- and CD8⁺-lymphocyte subpopulations compared to patients with chronic gastritis. The detected positive correlation between the AA-251 genotype of interleukin-8 and the risk of GU development in Khakassies indicated in favor of the existence of immuno-genetic regularities of GU development. The reasonability of determining population risk and protective genotypes of development of *HP*-associated GU in Khakassies is discussed.

Key words: *Helicobacter pylori*, gastric ulcer, Khakassies, Th1/Th2-immune response, allelic polymorphism genes, interleukin-8.

УДК 616.33002.44092:579.84(571.513)

Введение

Основной особенностью персистенции *Helicobacter pylori* (*HP*) является их длительное бессимптомное существование в организме человека [1–3, 15]. Для формирования адекватного протективного иммунитета против *HP* необходим смешанный Th1/Th2-ответ [4, 5]. Нарушение баланса между клеточной и гуморальной составляющими иммунореактивности приводит к изменению субпопуляционного состава Т-лимфоцитов периферической крови и модификации на-

бора цитокинов, продуцируемых Т-хелперами типа 1 и 2 (Th1 и Th2 соответственно) [6, 8, 13, 17–19].

Изменения подобного рода выступают признаком качественного и (или) количественного дисбаланса компонентов адаптивного иммунитета и способствуют формированию патологического ответа иммунной системы [7, 11]. Результатом этого является повышение чувствительности либо резистентности организма к инфицированию определенными субтипами VacA⁺ и (или) CagA⁺ *HP*, имеющими этнические закономерности [8, 10, 12].

Цель исследования — изучение особенностей патогенеза *HP*-ассоциированной язвенной болезни у жителей Республики Хакасия (представителей монголоидной и европеоидной популяций).

Материалы методы

Обследованы пациенты с язвенной болезнью (ЯБ) — жители пос. Матур, Анчуль, Верхний Курлугаш, Нижние Сиры, Большой Бор, Большая Сея, Верхняя Сея, Инчул, Верхний Таштып Таштыпского района и работники предприятия «Абаканвагонмаш» Республики Хакасия. Паттерн однонаправленных изменений у больных ЯБ желудка и двенадцатиперстной кишки позволил объединить их в одну группу [14]. Группу сравнения составили пациенты с хроническим гастритом. Обследованный контингент представлен двумя популяциями: хакасами (монголоиды, или коренные жители) и остальными жителями Республики Хакасия. С учетом того, что вторую популяцию более чем на 95% составляли русские, украинцы и белорусы, их обозначили европеоидами (или пришлыми жителями). Средний возраст европеоидов составил 43,6, монголоидов — 42,9 года. Число мужчин и женщин в исследовании было сопоставимым.

Эпидемиологический скрининг распространенности и клиникоморфологических характеристик ЯБ и диспепсии выполнен у 613 европеоидов и 630 монголоидов с использованием метода эзофагофиброгастродуоденоскопии. Исследование проведено на основании 25%-й случайной выборки. *HP* диагностировали при помощи морфологического и уреазного методов в слизистой оболочке желудка, а также с использованием уровня специфических иммуноглобулинов к *HP* методом твердофазного иммуноферментного анализа у 330 европеоидов и 293 монголоидов (по 15%-й случайной выборке).

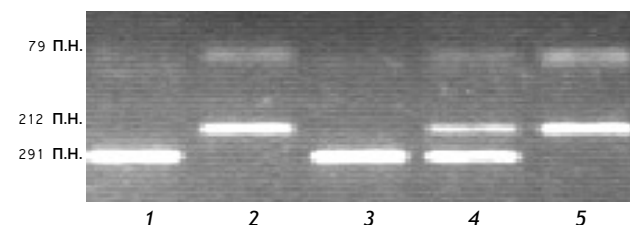
Состояние иммунной системы у больных изучали по общему числу лимфоцитов в периферической крови, а также по количеству их в субпопуляциях в периферической крови и биопсийном материале. Тестирование субпопуляций лимфоцитов (CD 4⁺, CD 8⁺ и CD 20⁺) слизистой оболочки антрального отдела желудка проводили на парафиновых срезах иммуногистохимическим методом с использованием моноклональных антител наборов фирмы Dako (Novocastra, Дания) при 400-кратном увеличении микроскопа в пяти случайно выбранных полях зрения (не менее 500 клеток). В крови иммунофенотип лимфоцитов (CD 3⁺, CD 4⁺ и CD 8⁺) определяли методом лазерной проточной цитофлюориметрии (Beckman Coulter EPICS XL, Швейцария) с применением моноклональных антител. Апоптотическую гибель лимфоцитов крови оценивали через 24 ч культивирования с использованием

микроскопа Micros (Австрия) при увеличении об. 100 х ок. 10 (окрашивание гематоксилином и эозином). Подсчитывали не менее 200 клеток. Критериями, характеризующими апоптоз, являлись карิโอпатологические и цитопатологические изменения в клетках (конденсация и маргинация хроматина, уменьшение объема клетки, пузырчатость и фрагментация клеточного ядра) [9]. *In vivo* процесс заканчивается фрагментацией клетки с образованием апоптотических телец. При некротической гибели преобладают процессы набухания, карioreксиса и кариолизиса с последующей ферментативной деградацией всей клетки [21].

Для исследования аллельного полиморфизма ИЛ-8 – 251 Т > А ДНК выделяли из венозной крови методом фенолхлороформной экстракции. Работы по генотипированию выполнены в НИИ медицинской генетики СО РАМН (г. Томск). Амплификацию проводили с использованием следующих праймеров:

F 5' TGTTCCTAACACCTGCCACTCTAGTA 3'
и R 5' TTATGACCCCTCATCTTTTCATTAT 3'

(«Сибэзним», г. Новосибирск). Наличие аллеля А формирует сайт рестрикции для Mfe I (рисунок). ПЦР продукты анализировали с помощью электрофореза в 4%-м агарозном геле. В качестве маркера размера ДНК использовали плазмиду pUC 19, расщепленную рестриктазой MspI («Сибэзним», г. Новосибирск).



Примеры идентификации генотипов по гену *IL8* –251 Т > А: 1 — контроль амплификации (291 п.н.); 2, 5 — генотип *IL8* –251 АА (79 и 212 п.н.); 3 — генотип *IL8* –251 ТТ (291 п.н.); 4 — генотип *IL8* –251 ТА (79, 212 и 291 п.н.)

Результаты представлены в виде $M \pm m$, где M — среднее арифметическое значение, m — среднее квадратичное отклонение среднего. Для проверки статистической значимости различий показателей в сравниваемых группах использовали t -критерий Стьюдента. Различия между группами считали значимыми для $p < 0,05$. В случае отсутствия нормальности распределения использовали критерии Вилкоксона и Манна–Уитни. Сравнение частот аллелей проводили с помощью критерия χ^2 с поправкой Йейтса на непрерывность, анализ ассоциации полиморфизмов с хрониче-

ским гастритом и язвенной болезнью — с помощью критерия отношения шансов (odds ratio — OR).

Результаты и обсуждение

Проведенное эпидемиологическое исследование распространенности язвенной болезни у коренных и пришлых жителей Республики Хакасия показало, что при высокой инфицированности *HP* (95,4% среди европеоидов и 95,2% среди монголоидов) имеются выраженные различия показателей заболеваемости среди представителей разных этнических популяций (8,1 и 4,5% соответственно).

Интерес исследователей в изучении механизмов, приводящих к манифестации заболевания при персистенции *HP*, сконцентрирован на лимфоцитах. Именно эти клетки представляют собой как регуляторное, так и эффекторное звено и определяют характер направленности локального иммунитета по T_H1/T_H2 -пути развивающегося в слизистой оболочке желудка воспалительного процесса. Кооперация клеток-эффекторов воспаления определяет местную реакцию на инфекцию. Однако следует отметить, что спектр бактериальных адгезинов обширен и определяет поливалентность этого феномена даже в масштабе одного вида патогена. Так, *CagA* - и *VacA* -позитивные штаммы *HP* оказывают разное влияние на активацию и соотношение субпопуляций лимфоцитов. Различия затрагивают также способность иммунокомпетентных клеток к миграции в слизистой оболочке желудка [20].

В проведенном исследовании локального иммунитета слизистой оболочки антрального отдела желудка в условиях

персистенции *HP* установлено явление иммунологической гетерогенности среди больных — представителей коренного и пришлого населения. При сравнительном изучении показателей субпопуляционного состава лимфоцитов слизистой оболочки антрального отдела желудка обнаружено, что у пациентов монголоидной группы выражена активация Т-клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа по сравнению с группой европеоидов. При этом наиболее существенные изменения отмечены у пациентов с ЯБ по сравнению с больными хроническим гастритом. Исследование фенотипа клеточного инфильтрата слизистой оболочки желудка обнаружило достоверное увеличение доли $CD4^+$ - и $CD20^+$ -лимфоцитов у больных ЯБ — представителей монголоидной популяции по сравнению с их количеством в группе европеоидов (табл. 1).

Результатом активации эпителиальных клеток продуктами микробного происхождения выступает продукция веществ провоспалительного действия, к числу которых прежде всего относятся цитокины. В свою очередь, цитокины (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-10, фактор некроза опухоли α , интерферон γ) активируют антигенпрезентирующие клетки, которые являются компетентными в запуске антигенспецифического T_H2 -иммунного ответа.

Оценка особенностей иммунного ответа у представителей коренного населения Хакасии позволила установить существенные изменения иммунологических показателей как у больных ЯБ, так и у пациентов с хроническим гастритом, инфицированных *HP*, по сравнению со здоровыми донорами. Повышенное содержание лимфоцитов крови у обследованных больных

Таблица 1

Доля лимфоцитов слизистой оболочки антрального отдела желудка, экспрессирующих кластер CD (%), у больных ЯБ и хроническим гастритом — представителей коренного и пришлого населения Республики Хакасия ($X \pm m$)

Кластер CD	Коренное население		Пришлое население	
	Больные ЯБ (22 человека)	Больные хроническим гастритом (23 человека)	Больные ЯБ (25 человек)	Больные хроническим гастритом (21 человек)
CD 4	33,6 ± 0,9	24,1 ± 0,4**	26,0 ± 0,8*	17,8 ± 0,9**
CD 8	16,3 ± 0,5	12,1 ± 0,2	19,3 ± 0,7	16,5 ± 0,4
CD 20	38,8 ± 0,9	34,4 ± 0,7	32,4 ± 0,7*	36,4 ± 0,8**

* $p < 0,05$ при сравнении монголоидов и европеоидов.

** $p < 0,01$ при сравнении больных язвенной болезнью и хроническим гастритом.

((54,0 ± 0,4)% у пациентов с ЯБ, (45,9 ± 0,7)% — у больных хроническим гастритом, $p < 0,05$) свидетельствовало об активации иммунной системы при персистенции *HP*. Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов крови позволило установить различия в состоянии иммунной системы у

больных ЯБ и хроническим гастритом монголоидной популяции (табл. 2). Наряду с этим при манифестации клинических проявлений язвенной болезни обнаружена тенденция к усилению апоптоза Т-лимфоцитов крови ((19,5 ± 0,6)% при (16,8 ± 0,9)% у здоровых доноров).

Таблица 2
Доля клеток периферической крови, экспрессирующих кластер CD (%), у больных ЯБ и хроническим гастритом – представителей коренного населения Республики Хакасия ($X \pm m$)

Кластер CD	Здоровые доноры (35 человек)	Больные хроническим гастритом (34 человека)	Больные ЯБ (21 человек)
CD 3	10,5 ± 0,8	72,7 ± 1,9*	83,0 ± 2,8***
CD 4	26,4 ± 0,9	40,9 ± 0,4*	30,0 ± 2,3***
CD 8	37,8 ± 1,4	50,8 ± 0,7*	33,2 ± 1,2***

* $p < 0,05$ при сравнении с контролем.

** $p < 0,05$ при сравнении больных язвенной болезнью и хроническим гастритом.

Вероятно, механизмы ускользания инфекта от адекватной иммунологической защиты макроорганизма и наличие хронической гиперантигенемии формируют иммунный ответ, характеризующийся относительно слабой напряженностью. Бактериальная мимикрия, антигенный дрейф, способность микроорганизмов управлять запрограммированной гибелью клеток организма хозяина приводят к тому, что инфект контролирует численность клеточных популяций, потенциально эффективных для радикального воспалительного ответа.

В настоящее время большой интерес вызывает концепция, согласно которой исход *HP*-инфицирования определяется генетически детерминированными особенностями иммунного ответа. Последний при персистенции *HP* имеет специфические (в том числе и этнически детерминированные) особенности, связанные с эволюционно сформировавшимися механизмами длительного существования организма человека и инфекта в условиях взаимoadaptации. Преобладание T_H2 -иммунного ответа у хакасов можно рассматривать как форму протективного иммунного ответа при развитии ЯБ у представителей монголоидной популяции, имеющую этнически детерминированный характер.

Возможным объяснением этому является наличие популяционно-зависимых ассоциаций между аллелями генов цитокинов и особенностями клинических признаков. Анализ встречаемости аллелей и генотипов $IL8_{-251} T > A$ показал различия в распределении частот генотипов ТА и АА- $251 IL8$ у пациентов с язвенной болезнью и здоровых доноров (табл. 3). Частота встречаемости генотипа АА у больных ЯБ была выше по сравнению с таковой у пациентов с хроническим гастритом и здоровых доноров ($p < 0,05$). Между генотипом АА и риском развития ЯБ у хакасов установлена сильная положительная взаимосвязь $OR = 3,1$ (95%-И CI 1,1–8,8).

Таблица 3
Распределение частот генотипов и аллелей гена-251 T > A $IL8$ у коренного населения Республики Хакасия

Показа-	Здоровые	Больные
---------	----------	---------

тель	доноры		Хронический гастрит		Язвенная болезнь	
	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.
<i>Генотипы</i>						
ТТ	42,8	54	45,4	29	44,8	13
ТА	44,4	56	43,7	28	24,1	7
АА	12,8	16	10,9	7	31,0*	9
<i>Аллели</i>						
Т	65,1	164	67,2	86	56,9	33
А	34,9	88	32,8	42	43,1	25

* Достоверность различий по сравнению с контролем $\chi^2 = 4,48$; $p < 0,05$; $OR = 3,1$ (95%-И CI 1,1–8,8).

Продукция $IL8$ идентифицируется как маркер адаптивного иммунитета на персистенцию *HP* в организме. От уровня продукции $IL8$ зависит выраженность и характер развития воспаления в слизистой оболочке желудка. Генотипы АА и ТА- $251 IL8$ ассоциированы с повышенной продукцией цитокина и риском развития атрофии антрального отдела желудка [16]. Наиболее высокий уровень цитокина в крови определяется при инфицировании *Ca9A(+)*-штаммами *HP*, имеющими высокую распространенность среди хакасов [8]. Вероятно, обнаруженные иммуногенетические особенности являются одним из объяснений дифференциации иммунного реагирования и клинических особенностей развития ЯБ у представителей монголоидной и европеоидной популяций.

Заключение

Таким образом, более выраженная у монголоидов ЯБ по сравнению с европеоидами активация Т-клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа сопровождается высоким содержанием $CD4^+$ - и $CD20^+$ -лимфоцитов в слизистой оболочке желудка. Изменения, выявленные в периферической крови у больных ЯБ, характеризовались снижением численности $CD4^+$ - и $CD8^+$ -субпопуляций лимфоцитов по сравнению с их количеством больных хроническим гастритом. В пользу существования иммуногенетических закономерностей развития язвенной болезни свидетельствовала выявленная положительная взаимосвязь между генотипом АА- $251 IL8$ и риском развития ЯБ у хакасов. В целом обнаруженные нарушения соотношения клеточного и гуморального звеньев иммунитета свидетельствуют о существенной роли популяционных особенностей иммунного реагирования в патогенезе *HP*-ассоциированной язвенной болезни.

Литература

1. Александрова В. А., Козлова И. П. Спорные и нерешенные вопросы хеликобактерной инфекции у детей // Лечащий врач. 2002. №11. С. 13–16.
2. Аруин Л. И., Григорьев П. Я., Яковенко Э. П. Хронический га-

- стрит. Амстердам, 1993. 362 С.
3. Баранская Е.К. Язвенная болезнь и инфекция HP // Рус. мед. журн. 2000. Т. 2, №1. С. 48—53.
 4. Козлова Н.Н., Прокопенко В.Д. Иммунный ответ при инфекции *Helicobacter pylori* // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2007. №4. С. 58—62.
 5. Новикова А.В., Газизова Р.Р., Шершевская А.Я. и др. Возрастные характеристики иммунных реакций при хроническом гастрите // Арх. патологии. 1995. Т. 57, №12. С. 61—64.
 6. Останина А.А., Пальцев А.И., Лебедев А.Г. и др. Характеристика апоптотической и функциональной активности лимфоцитов у больных язвенной болезнью // Бюл. СО РАМН. 2004. №1 (111). С. 129—134.
 7. Сельчук В.Ю., Никулин М.П. Рак желудка // Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН. 2005. www.neuch.ru.
 8. Цуканов В.В., Баркалов С.В., Тонких Ю.А. и др. Распространенность CagA-штаммов *Helicobacter pylori* и язвенная болезнь у населения Восточной Сибири // Терапевт. арх. 2007. №2. С. 15—18.
 9. Allen R.T., Hunter W.J., Agrawal D.K. Morphological and Biochemical Characterization and Analysis of Apoptosis // Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. 1997. V. 37, №4. P. 215—228.
 - 10.
 11. Camorlinga Ponce M., Torres J., Perez-Perez J. et al. Validation of a serological test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and the immune response to urease and CagA in children // Amer. J. Gastroent. 1998. №93. P. 1264—1270.
 12. Correa P. HP as a pathogen and carcinogen // J. Physiol. Pharmacol. 1997. V. 48. Suppl. 4. P. 19—24.
 13. Cover T.L., Berg D.E., Blaser M.J. VacA and the CagA pathogenicity of *H. pylori* // The immunobiology of *H. pylori* from pathogenesis to prevention. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, New York, 1997. P. 75—90.
 14. D'Elia M.M., Manghetti M., De Carli M. et al. T helper 1 effector cells specific for *Helicobacter pylori* in the gastric antrum of patients with peptic ulcer disease // J. Immunol. 1997. V. 158. P. 962—967.
 15. Goll R., Husebekky A., Isaksen V. et al. Increased frequency of antral CD4⁺ T and CD19⁺ B Cells in patients with *Helicobacter pylori*-related peptic ulcer disease // Blackwell Publishing Ltd. Scandinavian Journal of Immunology. 2005. V. 61. P. 92—97.
 16. Itoh T., Wakatsuki Y., Yoshida M. et al. The vast majority of gastric T cells are polarized to produce T helper 1 type cytokines upon antigenic stimulation despite the absence of *Helicobacter pylori* infection // J. Gastroenterol. 1999. V. 34. P. 560—570.
 17. Landi S., Moreno V., Gioia-Patricola L. et al. Association of common polymorphisms in inflammatory genes interleukin (IL)6, IL8, tumor necrosis factor- α , NF- κ B1, and peroxisome proliferator-activated receptor γ with colorectal cancer // Cancer Res. 2003. V. 63. P. 3560—3566.
 18. Lohoff M., Rollhoff M., Sommer F. *Helicobacter pylori* gastritis: a Th1 mediated disease? // J. Biotechnol. 2000. V. 83. P. 33—36.
 19. Luzzi F., Parrello T., Sebkova L. et al. Expression of proinflammatory and Th1 but not Th2 cytokines is enhanced in gastric mucosa of *Helicobacter pylori* infected children // Dig Liver Dis. 2001. V. 33. P. 14—20.
 20. McCarron S.L., Edwards S., Evans P.R. et al. Influence of cytokine gene polymorphisms on the development of prostate cancer // Cancer Res. 2002. V. 62. P. 3369—3372.
 21. Meyer F., Wilson K.T., James S.P. Modulation of innate cytokine responses by products of *Helicobacter pylori* // Infect. Immunol. 2000. V. 68. P. 6265—6272.
 22. Rigler R.J. Microfluorometric characterization of intracellular nucleic acids and nucleoproteins by acridine orange // Acta Physiologica Scandinavica (Suppl). 1996. V. 267. P. 1—122.

Поступила в редакцию 10.04.2009 г.

Утверждена к печати 17.06.2009 г.

Сведения об авторах

Е.С. Агеева — канд. мед. наук, зав. кафедрой фундаментальной медицины и гигиены ХГУ им. Н.Ф. Катанова (г. Абакан).

О.В. Штыгашева — д-р мед. наук, директор Медико-психологического института, зав. кафедрой, профессор кафедры внутренних болезней ХГУ им. Н.Ф. Катанова, зав. гастроэнтерологическим отделением ГУЗ «Хакасская республиканская больница им. Г.Я. Ремизовской» (г. Абакан).

Н.В. Рязанцева — д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой фундаментальной основ клинической медицины СибГМУ (г. Томск).

Для корреспонденции

Агеева Елизавета Сергеевна, тел. (3902) 34-27-20, e-mail: ageevaeliz@rambler.ru