

# ЭТНО-ПОПУЛЯЦИОННЫЕ ОСОБЕННОСТИ НЕКОТОРЫХ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ *HELICOBACTER PYLORI*

Агеева Е.С.<sup>1</sup>, Иптышев В.М.<sup>2</sup>, Штыгашева О.В.<sup>1</sup>,  
Рязанцева Н.В.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ГОУ ВПО «Хакасский государственный университет им. Н.Ф. Катанова», г. Абакан

<sup>2</sup> ГУЗ «Хакасская Республиканская больница им. Г.Я. Ремиевской», г. Абакан

<sup>3</sup> ГОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Томск

**Резюме.** Исследовали иммунофенотипический состав лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>) периферической крови при *Helicobacter pylori*-ассоциированных язвенной болезни, хроническом гастрите и раке желудка у коренных и пришлых жителей Хакасии. Оценивали апоптоз лимфоцитов крови. Установлены изменения иммунологических показателей у больных, инфицированных *Helicobacter pylori*, по сравнению с таковыми у здоровых доноров и между представителями коренного и пришлого населения Хакасии. Обсуждается роль нарушений регуляции локального и системного иммунитета при *Helicobacter pylori*-инфицировании.

**Ключевые слова:** *Helicobacter pylori*, рак желудка, язвенная болезнь, лимфоциты, CD-маркеры, апоптоз.

Ageeva E.S., Iptyshev V.M., Stygasheva O.V., Rysantseva N.V.

## ETHNIC AND POPULATION-SPECIFIC FEATURES OF SOME IMMUNOLOGICAL PARAMETERS IN CHRONIC *HELICOBACTER PYLORI* INFECTION

**Abstract.** Immunophenotype profile of lymphocytes (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>) from peripheral blood in gastric ulcer associated with *Helicobacter pylori*, chronic gastritis and stomach cancer has been studied in Khakassian aboriginals and migrants. Apoptosis of peripheral blood lymphocytes was also evaluated. Some alterations of immunological indexes were revealed in patients infected with *Helicobacter pylori*, as compared to healthy donors and migrants. The changes were characterized by a more intense apoptotic death of lymphocytes in the patients, when compared with numbers of apoptotic cells in control group. Probable role of apoptotic events in regulation of local and system immunity in *Helicobacter pylori* infection is discussed. (*Med. Immunol.*, 2012, vol. 14, N 3, pp 249-254)

**Keywords:** *Helicobacter pylori*, stomach cancer, gastric ulcer, lymphocytes, CD markers, apoptosis.

## Введение

Инфекция *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) является фактором риска развития хронического гастри-

та, язвенной болезни и рака желудка [12, 16, 17]. Признание *H. pylori*-ассоциированного гастрита общим патогенетическим фактором гастроуде-  
нальных заболеваний является подтверждением важной роли локального иммунитета в механиз-  
мах повреждения слизистой оболочки желудка [4, 11]. «Новой парадигмой» канцерогенеза явля-  
ется предложенный J. Houghton (2005) механизм развития *H. pylori*-ассоциированного рака желуд-

### Адрес для переписки:

Агеева Елизавета Сергеевна  
665004, Республика Хакасия, г. Абакан,  
ул. А.С. Пушкина, 178.  
Тел.: (3902) 23-47-20.  
E-mail: Ageevaeliz@rambler.ru

ка из костномозговых стволовых клеток [14], что является свидетельством системных дисфункций иммунитета при длительном бактериальном носительстве.

Ранее нами при проведении эпидемиологического исследования распространенности язвенной болезни у коренных и пришлых жителей Хакасии было выявлено, что при высокой инфицированности *H. pylori* (95,4% среди европеоидов и 95,2% среди хакасов) показатели заболеваемости язвенной болезнью среди представителей разных этнических популяций различаются (8,1 и 4,5% соответственно) [9].

В указанном аспекте определенный интерес представляет изучение этнических закономерностей функционирования иммунной системы у разных популяций (хакасов и европеоидов), проживающих на одной территории.

**Целью настоящего исследования** явилась оценка состояния системного иммунитета при хронической персистенции *H. pylori* у коренных и пришлых жителей Хакасии.

## Материалы и методы

Обследованы пациенты с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки (хакасы — 22 и европеоиды — 25), хроническим гастритом (хакасы — 23 и европеоиды — 21), раком желудка, ассоциированным с *H. pylori* (хакасы — 6 и европеоиды — 9). Обследованный контингент представлен двумя популяциями, проживающими в Хакасии: коренные жители (хакасы) и пришлые жители (русские или европеоиды). Все пациенты имели положительные результаты исследования на носительство *H. pylori*, подтвержденные хотя бы одним из четырех методов: быстрым уреазным тестом, морфологическим, полимеразно-цепной реакцией (наличие ДНК *H. pylori* в биоптатах слизистой оболочки желудка) и/или серологическим (определение уровня специфических IgG к *H. pylori* в сыворотке крови методом твердофазного ИФА, «Им-Ди Спектр» (г. Новосибирск, Россия). Группу контроля составили практически здоровые доноры (хакасы — 20 и европеоиды — 20), имевшие отрицательные результаты исследований на *H. pylori*. Средний возраст европеоидов составил 53,8 лет, хакасов — 49,9 лет.

Диагноз язвенной болезни, хронического гастрита и рака желудка был верифицирован посредством оценки морфологических изменений слизистой оболочки желудка на основе Сиднейской системы, биоптаты были получены во время прицельной фиброгастроуденоскопии.

Материалом для исследования являлась венозная кровь. Кровь забирали утром натощак из локтевой вены в количестве 10 мл в пробирку, содержащую 2,5% раствор ЭДТА.

Иммунофенотип лимфоцитов крови ( $CD3^+$ ,  $CD4^+$  и  $CD8^+$ ) определяли методом проточной цитофлуориметрии («Beckman Coulter EPICS XL», Швейцария) с применением моноклональных антител («R&D Systems», США). Результаты выражали в относительных (%) и абсолютных (тыс./мкл) значениях.

Для оценки апоптотической гибели лимфоцитов, клетки концентрировали в градиенте плотности фиколл-верографина, культивировали ( $3 \times 10^6$  клеток/мл в среде RPMI-1640 с L-глутамином (Sigma, UK), содержащим 10% ФТС и антибиотики). Подсчитывали не менее 200 клеток с использованием микроскопа «Micros» (Австрия) при увеличении объектив 100 × окуляр 10 (окрашивание гематоксилин-эозином). Критериями, характеризующими апоптоз *in vitro*, являлись кариопатологические и цитопатологические изменения (конденсация и маргинация хроматина, уменьшение объема клетки, пузырчатость и фрагментация клеточного ядра). Результаты выражали в %, характеризующих количество клеток с апоптотической морфологией ко всем остальным клеткам.

Для проверки нормальности распределения показателей использовали критерий Колмогорова—Смирнова. Для оценки достоверности различий выборку использовали критерии Вилкоксона и Манна—Уитни. Рассчитывали медиану (Me) и интерквартильный размах в виде 25 и 75 перцентилей ( $Q_{25}$  и  $Q_{75}$ ). Различия считались достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Нами было установлено, что у хакасов при язвенной болезни и хроническом гастрите повышено абсолютное и относительное количество лимфоцитов по сравнению с аналогичными показателями в контроле ( $p < 0,05$ ) (табл. 1). В группе больных раком желудка уровень лимфоцитов крови не отличался от показателей контрольной группы (табл. 1).

Среди европеоидов у пациентов с хроническим гастритом и язвенной болезнью отмечалось увеличение абсолютного и относительного количества лимфоцитов по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ). У больных раком желудка уровень лимфоцитов был ниже, чем в контроле ( $p < 0,05$ ; табл. 1).

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ С *H. PYLORI*-АССОЦИИРОВАННЫМИ ЯЗВЕННОЙ БОЛЕЗНЬЮ, ХРОНИЧЕСКИМ ГАСТРИТОМ И РАКОМ ЖЕЛУДКА

Группы	Хакасы		Европеоиды	
	абс., $\times 10^9/\text{л}$	отн., %	абс., $\times 10^9/\text{л}$	отн., %
Здоровые доноры	2,1 (1,7-2,3)	25,5 (21,0-28,8)	1,9 (1,8-2,2)	26,2 (20,3-27,9)
Больные ЯБ	3,4 (2,9-3,7) <sup>1</sup>	52,3 (46,0-59,2) <sup>1</sup>	2,3 (1,9-2,7) <sup>1</sup>	36,2 (30,3-40,0) <sup>1, 4</sup>
Больные ХГ	2,6 (2,3-2,8) <sup>1, 2</sup>	46,1 (39,5-53,4) <sup>1, 2</sup>	2,8 (2,2-3,4) <sup>1</sup>	39,5 (36,2-43,3) <sup>1</sup>
Больные РЖ	2,0 (1,8-2,6) <sup>2</sup>	24,4 (19,1-34,5) <sup>2, 3</sup>	2,1 (1,6-2,9)	19,2 (15,8-22,8) <sup>1, 2, 3</sup>

**Примечание.** <sup>1</sup> –  $p < 0,05$  достоверность различий по сравнению с контролем, <sup>2</sup> –  $p < 0,05$  - с хроническим гастритом, <sup>3</sup> –  $p < 0,05$  – с язвенной болезнью, <sup>4</sup> –  $p < 0,05$  при сравнении хакасов и европеоидов.

Изменения, выявленные при исследовании субпопуляционного состава лимфоцитов крови у хакасов, характеризовались снижением абсолютного и относительного числа  $\text{CD}3^+$ ,  $\text{CD}4^+$  и  $\text{CD}8^+$  лимфоцитов в группах больных по сравнению с контролем (табл. 2).

Наибольшее снижение относительного количества ( $\text{CD}3^+$ ,  $\text{CD}4^+$  и  $\text{CD}8^+$ ) лимфоцитов по сравнению с контролем отмечалось в группе хакасов, больных язвенной болезнью (табл. 2). На фоне снижения всех субпопуляций лимфоцитов отношение  $\text{CD}4^+/\text{CD}8^+$  у коренных жителей изменялось не одинаково (табл. 2). Отношение  $\text{CD}4^+/\text{CD}8^+$  увеличивалось у больных язвенной болезнью и было ниже контроля при хроническом гастрите и раке желудка.

Исследование Т-клеточного звена иммунитета у европеоидов характеризовалось повышением абсолютного и относительного числа субпопуляций лимфоцитов в группах больных хроническим гастритом и язвенной болезнью относительно контроля. В группе больных раком желудка наблюдалось угнетение абсолютного ( $\text{CD}3^+$ ,  $\text{CD}4^+$  и  $\text{CD}8^+$ ) содержания клеток (табл. 2). Отношение  $\text{CD}4^+/\text{CD}8^+$  во всех группах больных было выше, чем у здоровых доноров (табл. 2).

При межпопуляционном сравнении изменений показателей иммунитета нами было выявлено, что у европеоидов с хроническим гастритом уровни  $\text{CD}3^+$ ,  $\text{CD}4^+$  и  $\text{CD}8^+$  лимфоцитов превышали аналогичные показатели в группе хакасов ( $p < 0,05$ ). Такая же картина наблюдалась при сравнении фенотипического состава лимфоцитов у больных язвенной болезнью (табл. 2;  $p < 0,05$ ). У хакасов, больных раком желудка, отмечено преобладание показателей ( $\text{CD}3^+$ ,  $\text{CD}4^+$  и  $\text{CD}8^+$  лимфоцитов).

Показатель апоптоза лимфоцитов среди хакасов, больных язвенной болезнью, достоверно был выше, чем в контрольной группе (18,5 (16,8-19,8) и 15,7 (13,9-16,4) % соответственно,  $p < 0,05$ ). В группе пациентов с хроническим гастритом уровень апоптоза составил 14,8 (11,2-21,0) % и был ниже относительно контроля. У больных раком желудка апоптоз лимфоцитов соответствовал 23,7 (17,4-29,3) %, данный показатель превышал уровень апоптоза в контрольной группе ( $p < 0,05$ ).

У европеоидов в группе больных с язвенной болезнью и хроническим гастритом уровень апоптоза был выше, чем в контроле (21,4 (19,4-23,6), 24,3 (21,8-27,1) и 17,9 (16,5-19,0) %,  $p < 0,05$  соответственно). У больных раком желудка количество апоптотических лимфоцитов также превышало значение в группе контроля (26,8 (20,1-32,1) %,  $p < 0,05$ ).

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что активация иммунологических показателей у больных с различными клиническими проявлениями инфекции *H. pylori* (язвенная болезнь, хронический гастрит, рак желудка) происходит по-разному. Ранее при исследовании иммунофенотипа клеточного инфильтрата слизистой оболочки желудка нами было показано, что у хакасов при язвенной болезни более выражена активация Т-клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа по сравнению с больными хроническим гастритом. При этом наиболее существенные изменения гуморального звена выявлялись у пациентов с язвенной болезнью среди хакасов по сравнению с аналогичной группой европеоидов [1, 2].

Одним из проявлений нарушения иммунореактивности является изменение соотношения

ТАБЛИЦА 2. ИММУНОФЕНОТИП ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ С *H. PYLORI*-АССОЦИИРОВАННЫМИ ЯЗВЕННОЙ БОЛЕЗНЬЮ, ХРОНИЧЕСКИМ ГАСТРИТОМ И РАКОМ ЖЕЛУДКА

Доля клеток		Здоровые доноры	Больные ЯБ	Больные ХГ	Больные РЖ
<b>Хакасы</b>					
CD3 <sup>+</sup>	%	79,68 (54,62-86,77)	54,71 (38,42-58,91) <sup>1</sup>	62,70 (51,91-77,72)	64,2 (40,2-68,6)
	тыс./мкл	1,90 (1,40-2,61)	1,49 (1,36-1,86)	1,52 (1,30-1,93)	1,53 (1,29-2,32)
CD4 <sup>+</sup>	%	48,83 (41,94-65,98)	23,51 (31,94-38,18) <sup>1</sup>	33,65 (29,94-45,62) <sup>1</sup>	35,7 (24,4-41,71) <sup>1</sup>
	тыс./мкл	1,20 (0,87-1,41)	0,89 (0,83-1,09)	0,87 (0,71-1,16)	0,82 (0,64-1,21)
CD8 <sup>+</sup>	%	33,64 (26,13-55,04)	17,54 (13,13-21,16) <sup>1</sup>	23,31 (17,14-31,82) <sup>1</sup>	27,9 (16,3-38,23)
	тыс./мкл	0,66 (0,53-1,00)	0,54 (0,45-0,67)	0,64 (0,48-0,72)	0,64 (0,35-0,78)
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>		1,63 (1,30-1,92)	1,71 (1,47-1,87)	1,59 (1,33-1,95)	1,34 (1,12-2,14)
<b>Европеоиды</b>					
CD3 <sup>+</sup>	%	67,41 (44,83-73,56)	84,53 (61,62-88,03) <sup>3</sup>	77,73 (59,02-92,22)	60,9 (53,20-75,0)
	тыс./мкл	1,55 (1,39-1,78)	1,84 (1,73-2,09) <sup>1</sup>	2,22 (1,53-2,63) <sup>3</sup>	1,36 (0,52-1,79) <sup>2</sup>
CD4 <sup>+</sup>	%	38,03 (31,32-42,87)	51,51 (45,32-58,01) <sup>1,3</sup>	43,86 (36,71-55,31)	35,5 (21,63-51,81)
	тыс./мкл	0,89 (0,85-0,94)	1,06 (0,92-1,27)	1,36 (0,95-1,44) <sup>1</sup>	0,74 (0,34-1,07)
CD8 <sup>+</sup>	%	29,40 (27,55-32,41)	31,52 (25,61-35,37) <sup>1,3</sup>	34,27 (20,32-42,18)	25,8 (10,82-27,4)
	тыс./мкл	0,65 (0,55-0,72)	0,69 (0,51-0,74)	0,83 (0,57-1,10)	0,49 (0,21-0,63)
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>		1,35 (1,24-1,64)	1,64 (1,29-2,31)	1,49 (1,25-1,93)	2,0 (1,35-2,13)

**Примечание.** <sup>1</sup> –  $p < 0,05$  достоверность различий по сравнению с контролем, <sup>2</sup> –  $p < 0,05$  – с язвенной болезнью, <sup>3</sup> –  $p < 0,05$  при сравнении хакасов и европеоидов.

субпопуляций лимфоцитов [13]. В данном случае дисфункция иммунологических показателей при *H. pylori* инфекции проявлялись существенными межпопуляционными различиями. У хакасов наблюдалось снижение содержания в крови CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов. Особенно выражено у пациентов с язвенной болезнью, что можно рассматривать как проявление Т-клеточного иммунодефицита. У европеоидов, наоборот, наблюдалась более выраженная активация имму-

нологических показателей при язвенной болезни по сравнению с больными хроническим гастритом; снижение субпопуляций лимфоцитов отмечалось только у больных раком желудка.

Рак желудка является конечной стадией длительного хронического *H. pylori*-воспаления [5, 6]. Патологический процесс характеризуется прогрессирующим переходом от антрального к мультифокальному атрофическому гастриту, кишечной метаплазии, дисплазии и карциноме.

В этой связи закономерным фактом может быть функциональное истощение иммунологических показателей, выявленное нами при раке желудка.

Известно, что показатели системного иммунитета свидетельствуют о состоянии лимфопоза. Активация гемопоэтической функции костного мозга регулируется цитокинами, ростовыми факторами, выработка которых происходит преимущественно в очаге воспаления [10, 18]. Снижение активности клеточного звена иммунитета может быть связано с угнетением лимфопоза на уровне центральных органов иммунной системы, с нарушением их миграции на периферию, накоплением клеток в органах-мишенях при воспалении, а также с угнетением антиген-зависимой стадии развития иммуноцитов либо с активацией апоптоза и усилением их гибели. Вероятно, выявленное нами усиление апоптотической гибели иммунокомпетентных клеток крови в ответ на *H. pylori*-инфекцию вносит значительный вклад в формирование несостоятельности иммунного ответа [3, 15, 19].

Вероятно, различия иммунологических показателей у хакасов и европеоидов можно объяснить гетерогенностью субтипов патогена. Исследования, проведенные нами ранее, показали этно-экологическую обусловленность распределения штаммов *H. pylori*: у пришлых жителей с язвенной болезнью связаны  $S_1S_2$  субтипы VacA штаммы, у коренных жителей — CagA [7, 8].

## Заключение

Обсуждается роль нарушений регуляции системного иммунитета при *Helicobacter pylori*-инфицировании.

## Список литературы

1. Агеева Е.С., Штыгашева О.В., Цуканов В.В., Рязанцева Н.В. Иммунологические особенности течения гастродуоденальной патологии у жителей Хакасии // Иммунология. — 2009. — Т. 30, № 3. — С. 162-165.
2. Агеева Е.С., Штыгашева О.В., Рязанцева Н.В., Цуканов В.В. Молекулярно-генетические факторы, влияющие на исход инфицирования *Helicobacter pylori* у жителей Республики Хакасия // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. — 2010. — № 4 — С. 13-18.
3. Аруин Л.И. Инфекция *Helicobacter pylori* и рак желудка // Клиническая и экспериментальная гастроэнтерология. — 2006. — № 1.—С. 15-22.
4. Козлова Н.Н., Прокопенко В.Д. Иммунный ответ организма на инфекцию *Helicobacter pylori* // Иммунопатология, аллергология, инфектология. — 2007. — № 4. — С. 58-62.
5. Кононов А.В. Воспаление как основа *Helicobacter pylori*-ассоциированных болезней // Архив патологии. — 2006. — Т. 68, вып. 5. — С. 3-10.
6. Кононов А.В. Генетическая регуляция и фенотип воспаления при *Helicobacter pylori*-инфекции // Архив патологии. — 2009. — Т. 71, № 5. — С. 57-63.
7. Останин А.А., Пальцев А.И., Лебедев А.Г., Никонов С.Д., Васильченков А.В., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Черных Е.Р. Характеристика апоптотической и функциональной активности лимфоцитов у больных язвенной болезнью // Бюллетень СО РАМН. — 2004. — № 1 (111). — С. 129-134.
8. Цуканов В.В., Баркалов С.В., Штыгашева О.В., Бронникова Е.П., Тонких Ю.Л., Амельчугова О.С., Бармаков А.Е. Распространенность CagA-штаммов *Helicobacter pylori* и язвенная болезнь у населения Восточной Сибири // Терапевтический архив. — 2007. — № 2. — С. 15-18.
9. Штыгашева О.В., Агеева Е.С., Харьков В.Н., Степанов В.А. Гены и болезни Хакасов. — Красноярск: Поликор, 2010. — 296 с.
10. Штыгашева О.В., Цуканов В.В. Ассоциация cag A и vac A штаммов *Helicobacter pylori* и язвенной болезни в организованной популяции г. Абакана // Росс. журнал гастроэнтер., гепатологии и колопроктол. — 2004. — № 2. — С.84-87.
11. Юшук Н.Д., Маев И.В., Гуревич К.Г. Иммунный ответ при инфекции, вызванной *Helicobacter pylori* // Журн. Микробиологии. — 2003. — № 6. — С. 86-91.
12. D'Ellios M.M., Anderson L.P. *Helicobacter pylori* Inflammation, Immunity, and Vaccines // *Helicobacter*. — 2007. — Vol. 12 (1). — P. 15-19.
13. Goldblum J.R., Richter J.E., Vaezi M., Falk G.W., Rice T.W., Peek R.M. *Helicobacter pylori* infection, not gastroesophageal reflux, is the major cause of inflammation and intestinal metaplasia of gastric cardiac mucosa // *Am. J. Gastroenterol.* — 2002. — Vol. 97 (2). — P. 302-311.
14. Houghton J., Wang T.C. *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer: A New paradigm for Inflammation-Associated Epithelial Cancer // *Gastroenterology*. — 2005. — Vol. 128. — P. 1567-1578.
15. Isomoto H., Moss J., Hirayama T. Pleiotropic action of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, VacA // *Tohoku J. Exp. Med.* — 2010. — Vol. 220, N 1. — P. 3-14.

16. Jones K.R., Joo Y.M., Jang S., Yoo Y.-J., Lee H.S., Chung I.-S., Olsen C.H., Whitmire J.M., Merrel D.S., Cha J.-H. Polymorphism in the CagA EPIYA Motif Impact Development of Gastric Cancer // J. of Clinical Microbiology. — 2009. — Vol. 47, N 4. — P. 959-968.

17. Kountrek P.C., Kountrek S.J., Brzozowski T. Helicobacter pylori infection in gastric cancerogenesis // J. Physiol. Pharmacol. — 2009. — Vol. 60, N 3. — P. 3-21.

18. Moss S.F., Malfertheiner P. Helicobacter and Gastric Malignancies // Helicobacter. — 2007. — Vol. 12 (S. 1). — P. 23-30.

19. Soares G., Reyes V.E., Beswick E.J. Immune response to H. pylori // World J. Gastroenterology. — 2006. — Vol. 12 (35). — P. 5593-5598.

*поступила в редакцию 22.06.2011*

*отправлена на доработку 26.06.2011*

*принята к печати 05.07.2011*