

## Роль нарушений системы цитокинов в патогенезе *Helicobacter pylori*-ассоциированной патологии

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

## The role disorders at system of cytokines in pathogenesis of *Helicobacter pilory*-associated pathology

Ageyeva Ye.S., Shtygasheva O.V., Iptyshev V.M., Ryazantseva N.V.

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

<sup>2</sup> Хакасская республиканская больница им. Г.Я. Ремиевской, г. Абакан

<sup>3</sup> Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

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

Обследовано 55 хакасов с *Helicobacter pylori*-ассоциированными язвенной болезнью и хроническим гастритом. Целью работы являлось оценить продукцию интерлейкинов IL-2, IL-4, IL-10 у пациентов с хронической персистенцией *Helicobacter pylori*. Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови определяли методом проточной цитофлуориметрии. Апоптоз оценивали методом световой микроскопии. Продукцию IL-2, IL-4, IL-10 в супернатантах определяли твердофазным иммуноферментным методом. Изменения, выявленные в крови у больных, инфицированных *Helicobacter pylori*, характеризовались увеличением количества и субпопуляционным дисбалансом лимфоцитов, модификацией апоптоза, истощением функциональной активности лимфоцитов.

**Ключевые слова:** *Helicobacter pylori*, язвенная болезнь, хакасы, апоптоз, иммунный ответ, лимфоциты.

Fifty five Khakas people with *Helicobacter pylori*-associated ulcer disease and chronic gastritis were examined in order to estimate the production of IL-2, IL-4, and IL-10 interleukins in patients with chronic *Helicobacter pylori* persistence. The subpopulation composition of lymphocytes of peripheral blood was determined by the method of flow-through cytofluorometry. Apoptosis was estimated by the method of optical microscopy. The IL-2, IL-4, IL-10 production in supernatants was determined by the solid-phase immunoenzymometric method. Changes revealed in the blood of patients infected with *Helicobacter pylori* were characterized by the increased amount and subpopulation disbalance of lymphocytes, apoptosis modification, and depletion of lymphocyte functional activity.

**Key words:** *Helicobacter pylori*, ulcerative disease, Khakasses, apoptosis, immune response, lymphocytes.

УДК 616-092.19:579.835.12

### Введение

Инфекция *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) и ассоциированные с ней заболевания относятся к актуальным проблемам современной медицинской науки. Многочисленные исследования в области иммунологии и патофизиологии этого инфекционного процесса внесли существенный вклад в понимание механизмов персистенции *H. pylori* в организме [4, 9, 11, 15]. Установлено, что персистенция *H. pylori* связана со способностью возбудителя к взаимодействию с иммунной системой человека и адаптацией к ее изменениям [8]. Известно, что дисрегуляция Th1/Th2-системы является важным звеном патогенеза *H. pylori* персистентной инфекции, определяя клинический полиморфизм и исход заболеваний [3, 7].

Известно, что лимфоциты дифференцируются на две основные субпопуляции Т-хелперов (Th1 и Th2), различающихся набором секретируемых цитокинов. Активация Т-лимфоцитов заключается в индукции экспрессии генов ростовых факторов, в частности IL-2, который готовит клетку к пролиферации и дифференцировке по Th1-пути [2]. Дифференцировка лимфоцитов по Th2-пути иммунного ответа контролируется преимущественно IL-4 [1], который, являясь антагонистом IL-2, смещает направленность иммунного ответа в сторону Th2-пути. Эффекты IL-4 связаны с ингибцией продукции цитокинов и хемокинов Th1-пути (фактор некроза опухолей  $\alpha$ , интерлейкины IL-1, IL-12), а также с подавлением продукции макрофагами супероксидных и нитроксидных радикалов. IL-10, как и IL-4, участвует

в реализации негативной регуляции провоспалительных функций иммунокомпетентных клеток, усиливает Th2-опосредованные реакции. В то же время увеличение продукции IL-10 ведет к снижению противоинфекционной защиты, развитию хронического персистирующего воспаления [13].

Учитывая важную роль дисрегуляции Th1/Th2-системы в патогенезе хронического инфекционного процесса, целью настоящего исследования явилась оценка продукции IL-2, IL-4 и IL-10 лимфоцитами крови у пациентов с *H. pylori*-ассоциированной патологией.

## Материал и методы

Обследовано 55 пациентов — носителей *H. pylori*, в родословных которых не было смешанных браков. Все участники исследования являлись коренными жителями Республики Хакасия. У всех обследованных выявлялись специфические иммуноглобулины G к *H. pylori* с использованием метода твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) (тест-система «ИмДи-спектр», г. Новосибирск). Обследованные пациенты страдали хронической патологией желудочно-кишечного тракта (язвенная болезнь (ЯБ) диагностирована у 21 пациента, хронический гастрит (ХГ) — у 34 пациентов). Контрольная группа была сформирована из 35 здоровых доноров — коренных жителей Хакасии.

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

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

Для исследования цитокинпродуцирующей способности лимфоцитов выделенные клетки ресуспендировали в полной питательной среде (90%-я RPMI-1640 (ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск), 10%-я инактивированная эмбриональная телячья сыворотка (ООО «Биолот», г. Санкт-Петербург), 0,3 мг/мл L-глутамин). Для определения спонтанной продукции цитокинов клетки культивировали без митогена, для стимуляции секреторной функции в пробы вносили 10 мкл/мл фитогемагглютинина (ФГА) (Difco, Германия), культивировали в течение 24 ч при температуре 37 °C и 5%

CO<sub>2</sub>. Концентрацию IL-2, IL-4 и IL-10 определяли в супернатантах с помощью ИФА (тест-система ProCon, г. Санкт-Петербург) на микропланшетном фотометре Immunochem 2100 (High Technology, США) (при длине волны 450 нм).

Для оценки апоптотической гибели клетки концентрировали в градиенте плотности фиколл-верографина. Апоптотическую гибель лимфоцитов оценивали через 24 ч культивирования с использованием микроскопа Micros (Австрия) при увеличении объективов 100 х окуляр 10 (окрашивание гематоксилином и эозином). Подсчитывали не менее 200 клеток. Критериями, характеризующими апоптоз *in vitro*, являлись кариопатологические и цитопатологические изменения (конденсация и маргинация хроматина, уменьшение объема клетки, пузырчатость и фрагментация клеточного ядра). При некротической гибели преобладали процессы набухания, кариорексиса и кариолизиса с последующей ферментативной деградацией всей клетки [10]. Результаты выражали в процентах, характеризующих количество клеток с апоптотической морфологией ко всем остальным клеткам.

Для проверки нормальности распределения показателей использовали критерий Колмогорова—Смирнова. Оценку достоверности различий выборок проводили при помощи критериев Вилкоксона и Манна—Уитни. Рассчитывали медиану *Me* и интерквартильный размах в виде 25-го и 75-го перцентилей ( $Q_{25}$ — $Q_{75}$ ). Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Установлено, что у пациентов с хронической инфекцией *H. pylori* отмечалось повышение абсолютного и относительного количества лимфоцитов крови по сравнению с аналогичными показателями в контрольной группе ( $p < 0,05$ ). При этом у больных язвенной болезнью увеличение числа лимфоцитов происходило в большей степени (52,3 (46,0—59,2)% и 3,4 (2,9—3,7) · 10<sup>9</sup>/л), чем при хроническом гастрите (46,1 (39,5—53,4)% и 2,6 (2,3—2,8) · 10<sup>9</sup>/л),  $p < 0,05$ . В обеих группах обследования число лимфоцитов было достоверно выше, чем в контроле (25,5 (21,0—28,8)% и 2,1 (1,7—2,3) · 10<sup>9</sup>/л соответственно),  $p < 0,05$ .

Кроме того, у больных с хроническим носительством *H. pylori* установлено снижение абсолютного и относительного количества  $CD3^+$ ,  $CD4^+$  и  $CD8^+$ -лимфоцитов по сравнению с контрольными значениями

(табл. 1). Наибольшее снижение числа CD3<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов отмечалось у пациентов с ЯБ. При этом в данной группе больных на фоне снижения числа всех субпопуляций лимфоцитов увеличивался иммунорегуляторный индекс (ИРИ) CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (табл. 1).

Таблица 1  
Иммунофенотип лимфоцитов крови у пациентов с *Helicobacter pylori*-ассоциированной патологией (Me (Q<sub>1</sub>–Q<sub>3</sub>))

Доля клеток		Здоровые доноры (n = 35)	Больные ЯБ (n = 21)	Больные ХГ (n = 34)
CD3 <sup>+</sup>	%	89,68 (62,85–97,00)	54,71 (36,52–59,201)*	62,74 (51,64–78,65)
	тыс./мкл	1,99 (1,32–2,67)	1,51 (1,31–2,10)	1,60 (1,27–1,97)
CD4 <sup>+</sup>	%	58,83 (40,93–78,63)	31,97 (22,64–38,71)*	33,65 (29,84–46,11)
	тыс./мкл	1,20 (0,85–1,43)	0,92 (0,82–1,20)	0,87 (0,71–1,19)
CD8 <sup>+</sup>	%	33,64 (25,09–56,00)	17,51 (12,20–21,45)*	23,32 (16,94–32,41)
	тыс./мкл	0,66 (0,53–1,06)	0,54 (0,45–0,68)	0,66 (0,47–0,72)
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>		1,63 (1,28–1,93)	1,73 (1,38–1,88)	1,53 (1,31–1,96)

Примечание. n — число обследованных, \* — p < 0,05 достоверность различий по сравнению с показателями у здоровых доноров.

Полученные результаты свидетельствуют о снижении содержания субпопуляций лимфоцитов Т-клеточного звена у больных хроническим гастритом и язвенной болезнью, ассоциированных с *H. pylori*, что можно рассматривать как проявление Т-клеточного иммунодефицита. Такое перераспределение субпопуляций лимфоцитов может быть связано с миграцией клеток в слизистую оболочку, а также с элиминацией иммунокомпетентных клеток за счет индукции апоптоза. Фактические доказательства этого предположения получены при оценке доли апоптотических лимфоцитов. Исследование показало, что в группе пациентов с ЯБ их было достоверно больше, чем в контрольной группе (18,5 (16,8–19,8)% и 15,7 (13,9–16,4)% соответственно, p < 0,05). Уровень апоптотической гибели лимфоцитов у пациентов с ХГ составил 14,8 (11,2–21,0)% и был ниже относительно контрольных значений.

Известно, что апоптоз иммунокомпетентных клеток может быть инициирован как самим возбудителем, так и нарушениями метаболических процессов макроорганизма. При этом в ряде случаев Th1-лимфоциты более чувствительны к апоптозу, чем Th2-клетки, что следует

рассматривать как дополнительный механизм ограничения Th1-опосредованного иммунного ответа [14].

Одной из важных причин снижения количества лимфоцитов и (или) их субпопуляций может служить угнетение процессов лимфопротиферации. Существует несколько причин низкого пролиферативного ответа лимфоцитов. В качестве возможных рассматривают недостаточность активирующего сигнала, связанную с низким уровнем продукции активирующих цитокинов либо с гиперпродукцией ингибирующих цитокинов.

При оценке уровня секреции цитокинов лимфоцитами у больных ХГ и ЯБ отмечалось значительное уменьшение как спонтанной, так и ФГА-стимулированной продукции IL-2 по сравнению с аналогичными показателями контрольной группы (табл. 2). В то же время базальный и резервный уровни цитокинов IL-4 и IL-10 *in vitro* у пациентов с хроническим гастритом и язвенной болезнью были выше, чем аналогичные показатели в группе контроля (табл. 2). Полученные результаты свидетельствуют об угнетении Th1-пути иммунного ответа у пациентов с *H. pylori*-ассоциированными хроническим гастритом и язвенной болезнью и активации Th2-пути.

Таблица 2  
Базальная и ФГА-стимулированная продукция IL-2, IL-4, IL-10 мононуклеарными клетками у пациентов с *Helicobacter pylori*-ассоциированной патологией (Me (Q<sub>1</sub>–Q<sub>3</sub>)), пг/мл

Продукция		Здоровые доноры	Больные ЯБ	Больные ХГ
IL-2	Спонтанная	141,7 (39,0–220,0)	45,0 (30,0–112,0)	89,0 (75,1–93,0)
	ФГА-стимулированная	190,0 (70,0–279,0)	119,0 (90,0–205,9)	139,0 (112,0–164,9) <sup>#</sup>
IL-4	Спонтанная	35,0 (16,0–44,3)	98,0 (84,0–131,6)*	101,0 (89,0–109,5) *
	ФГА-стимулированная	123,3 (69,0–147,6) <sup>#</sup>	197,0 (176,0–342,7)* <sup>#</sup>	189,0 (167,0–262,0)* <sup>#</sup>
IL-10	Спонтанная	57,3 (32,0–78,2)	342,9 (289,0–402,0) <sup>*</sup>	309,0 (239,0–369,8)*
	ФГА-стимулированная	128,0 (90,0–134,0) <sup>#</sup>	509,0 (470,0–549,0)* <sup>#</sup>	443,5 (397,0–535,0)* <sup>#</sup>

\* — p < 0,05 – по сравнению с показателями у здоровых доноров.

<sup>#</sup> – p < 0,05 – достоверность различий при сравнении спонтанной и ФГА-стимулированной продукции цитокина.

Известно, что Th1-ответ препятствует колонизации *H. pylori* в слизистой оболочке. Однако при длительном воспалительном процессе происходит гибель собственных клеток [5, 6, 12]. Детерминация Th2-пути протекает без выраженного повреждения слизистой

оболочки и также может рассматриваться как протективная форма антихеликобактерной защиты [2, 4]. Наряду с этим *H. pylori* является длительно персистирующей инфекцией, в результате которой развивается гиперактивация иммунной системы с последующей декомпенсацией по количественным и качественным признакам и, соответственно, снижением эффективности иммунного ответа. В связи с этим увеличение продукции мононуклеарными лейкоцитами крови ИЛ-4 и ИЛ-10, вероятно, можно рассматривать как фактор, способствующий хронизации заболеваний, связанных с *H. pylori*-инфекцией.

### Заключение

Проведенное исследование позволило выявить изменение иммунологических показателей у больных с *H. pylori*-ассоциированными заболеваниями. Данные изменения касались нарушения продукции цитокинов и характеризовались угнетением Th1-пути и активацией Th2-пути иммунного ответа при хроническом гастрите и язвенной болезни. Дальнейшее изучение молекулярных механизмов функционирования иммунной системы при инфекции *H. pylori* позволит идентифицировать новые подходы в предупреждении и коррекции иммунопатологических расстройств данных социально значимых заболеваний.

*Работа выполнена при поддержке гранта «Разработка технологической платформы молекулярной диагностики и лечения социально значимых заболеваний и подготовка на ее основе научно-исследовательских кадров для молекулярной медицины» (ГК № 02.740.11.0311 (2009—2011 гг.)).*

### Литература

1. Ивашкин В.Т. Основные понятия и положения фундаментальной иммунологии // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. 2008. № 4. С. 4—13.
2. Козлова Н.Н., Прокопенко В.Д. Иммунный ответ организма на инфекцию *Helicobacter pylori* // Иммунопатология, ал-

3. Кондрашина Э.А., Калинина Н.М., Давыдова Н.И. и др. Особенности цитокинового профиля у пациентов с хроническим *H. pylori*-ассоциированным гастритом и язвенной болезнью // Цитокины и воспаление. 2002. Т. 1, № 4. С. 3—11.
4. Кононов А.В. Генетическая регуляция и фенотип воспаления при *Helicobacter pylori*-инфекции // Архив патологии. 2009. Т. 71, № 5. С. 57—63.
5. Кононов А.В. Молекулярная генетика и фенотип воспаления, вызванного *Helicobacter pylori* // Омск. науч. вестн. 2007. № 3 (61). С. 17—23.
6. Маев И.В., Кучерявый Ю.А., Оганесян Т.С. Аллельный полиморфизм интерлейкина-1 при геликобактериозе // Иммунология. 2008. № 5. С. 4—11.
7. Останин 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.
8. Юсук Н.Д., Маев И.В. Что скрывается за нелеченой инфекцией *Helicobacter pylori* // Терапевт. архив. 2008. № 11. С. 72—77.
9. Юсук Н.Д., Маев И.В., Гуревич К.Г. Иммунный ответ при инфекции, вызванной *Helicobacter pylori* // Журн. микробиологии. 2003. № 6. С. 86—91.
10. Allen R.T., Hunter W.J., Agrawal D.K. Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis // J. of Pharmacol. and Toxicol. Methods. 1997. V. 37, № 4. P. 215—228.
11. D'Ellios M.M., Anderson L.P. *Helicobacter pylori* Inflammation, immunity, and vaccines // *Helicobacter*. 2007. V. 12 (1). P. 15—19.
12. Goll R., Husebekk A., Isaksen V. et al. Increased frequency of antral CD4<sup>+</sup> T and CD19<sup>+</sup> B cells in patients with *Helicobacter pylori*-related peptic ulcer disease // *Scand. J. Immunol.* 2005. V. 61. P. 92—97.
13. Jung M., Sabat R., Kratzschmar J. et al. Expression profiling of IL-10-regulated genes in human monocytes and peripheral blood mononuclear cells from psoriatic patients during IL-10 therapy // *Eur. J. Immunol.* 2004. V. 34. P. 481—493.
14. Morris S.C., Stephani M.H., DeBroski R.H. et al. Endogenously produced IL-4 nonredundantly stimulates CD8<sup>+</sup> T cell proliferation // *J. Immunol.* 2009. V. 182. P. 1429—1438.
15. Suares G., Reyes V.E., Beswick E.J. Immune response to *H. pylori* // *World J. Gastroenterology*. 2006. V. 12 (35). P. 5593—5598.

Поступила в редакцию 11.05.2011 г.

Утверждена к печати 20.09.2011 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, профессор, зав. кафедрой внутренних болезней ХГУ им. Н.Ф. Катанова (г. Абакан).

**В.М. Иптышев** — зав. клинико-диагностической лабораторией ХРБ им. Г.Я. Ремишевской, гл. внештатный специалист Министерства здравоохранения Республики Хакасия по клинической лабораторной диагностике (г. Абакан).

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

**Для корреспонденции**

*Агеева Елизавета Сергеевна*, тел. 8 (39-02) 34-27-20; e-mail: Ageevaeliz@rambler.ru