УДК 616.98:579.835.12

Агеева Е.С. [1], Иптышев В.М.[1,2], Саранчина Ю. В. [1] , Штыгашева О. В. [1]

РОЛЬ АПОПТОЗА ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ В ДИЗРЕГУЛЯЦИИ ИММУННОГО ОТВЕТА У ПАЦИЕНТОВ С АТРОФИЧЕСКИМ ГАСТРИТОМ

[1] – ФГБОУ ВПО Хакасский государственный университет им. Н. Ф. Катанова, г. Абакан
2 – ГБУЗ «Республиканская клиническая больница им. Г. Я. Ремишевской», г. Абакан

Резюме. *Helicobacter pylori-ассоциированные заболевания (хронический гастрит, атрофический гастрит) сопровождаются дизрегуляцией процессов клеточной гибели. Исследовали уровень спонтанного и индуцированного перекисью водорода апоптоз лимфоцитов крови у пациентов с атрофическим гастритом у хакасов и европеоидов. Установлено, что наряду с увеличением уровня лимфоцитов крови индекс активации апоптоза был ниже у пациентов с Helicobacter pylori-инфекцией при сравнении с группой здоровых доноров. Данный факт является свидетельством уже имеющейся проапоптотической активации лимфоцитов крови больных с Helicobacter pylori-инфекцией. Обсуждается роль нарушений апоптоза в регуляции иммунного ответа при Helicobacter pylori-инфицировании.*
Ключевые слова: *Helicobacter pylori; атрофический гастрит; хакасы; апоптоз; иммунный ответ; лимфоциты.*

Ageeva E.S. [1], Iptyshev V.M. [1,2], Saranchina Yu.V. [1], Shtygasheva O.V. [1]

THE ROLE OF APOPTOSIS OF LYMPHOCYTES AT BLOOD IN DYSREGULATION OF THE IMMUNE RESPONSE FROM PATIENTS WITH ATROPHIC GASTRITIS

Summary. *Helicobacter pylori-associated diseases (chronic gastritis, atrophic gastritis) are accompanied by dysregulation of cell death. Examined the level of spontaneous and induced by hydrogen peroxide apoptosis blood lymphocytes in patients with atrophic gastritis among at the Khakas and the Caucasoids of the Republic of Khakassia. Found that an increase in the activation of lymphocytes apoptosis index was lower in patients with Helicobacter pylori-infection when compared with the group of healthy donors. This fact is the evidence already available proapoptotic activation of blood lymphocytes from patients with Helicobacter pylori-infection. The role of apoptosis in violations of the regulation of immune response in Helicobacter pylori-infection.*
Key words: *Helicobacter pylori; Atrophic Gastritis; Khakas; Apoptosis; Immune response; Lymphocytes.*

Введение. Известно, что исход взаимодействия макроорганизма и Helicobacter pylori (HP) во многом определяется состоянием иммунной системы. Одним из механизмов длительной персистенции HP является цитопатический эффект в отношении лимфоцитов и модификация иммунного ответа макроорганизма.

При проведении эпидемиологического исследования распространенности язвенной болезни у коренных и пришлых жителей Республики Хакасия было выявлено, что при высокой инфицированности HP (95,4 % среди европеоидов и 95,2 % среди хакасов) показатели заболеваемости среди представителей разных этнических популяций различаются (8,1 и 4,5%, соответственно) [5]. Было показано, что различия в заболеваемости у хакасов и европеоидов заключаются в генетически-детерминированных различиях иммунного ответа [1-4].

Таким образом, представление об эффектах HP, приводящих к неэффективности иммунитета, могут быть ключевыми в понимании патогенеза HP-ассоциированных заболеваний и создании успешной стратегии направленной против колонизации патогена и снижения риска развития заболеваний.

Целью исследования являлась оценка апоптоза лимфоцитов периферической крови у европеоидов и монголоидов, проживающих на территории Хакасии, в условиях хронической персистенции HP.

Материал и методы. Обследованный контингент представлен двумя популяциями: хакасы (монголоиды или коренные жители) и остальные жители Республики Хакасия. С учетом того, что во второй популяции более 95 % составляли русские, украинцы и белорусы, мы обозначили ее европеоидами (или пришлые жители). Были обследованы пациенты с хроническим поверхностным гастритом (60 европеоидов и 68 хакасов) и атрофическим гастри-

том (49 европеоидов и 46 хакасов). Средний возраст европеоидов составил 43,6 года, монголоидов – 42,9 лет. В исследовании приняли участие сопоставимое количество мужчин и женщин. Группу контроля составили 35 практически здоровых доноров, имеющих отрицательные результаты исследований на HP.

Диагноз хронического атрофического и неатрофического гастрита был верифицирован посредством оценки морфологических изменений слизистой оболочки желудка на основе Сиднейской системы [7]. HP диагностировали при помощи морфологического и уреазного методов в слизистой оболочке желудка. Для определения HP в биоптате из антрального отдела желудка использовали метод полимеразно-цепной реакции (ПЦР). Уровень специфических Ig к HP в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА).

Для оценки апоптотической гибели лимфоцитов крови клетки выделяли из гепаринизированной венозной крови, концентрировали в градиенте плотности. Лимфоцитарный концентрат переносили в раствор Хэнкса (без ионов Ca^{2+} и Mg^{2+}) с добавлением 2 % инактивированной фетальной телячьей сыворотки и 0,02 М ЭДТА. Жизнеспособность клеток оценивали окрашиванием трипановым синим (обычно она составляла более 97 %). Изолированные клетки отмывали и культивировали в концентрации $3x10^6$ клеток/мл в среде RPMI 1640 с L-глутамином (SIGMA, UK) содержащим 10 % ФТС и антибиотики. Апоптотическую гибель лимфоцитов крови оценивали через 24 ч культивирования с использованием микроскопа «MICROS» (Австрия) при увеличении объектив 100 х окуляр 10 (окрашивание гематоксилин-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). In vivo процесс заканчивается фрагментацией клетки с образованием апоптотических телец. При некротической гибели преобладали процессы «набухания», кариорексиса и кариолизиса с последующей ферментативной деградацией всей клетки [6].

Результаты измерений представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха 25 и 75 процентилей (Q25 и Q75). Для проверки нормальности распределения показателей использовали критерий Колмогорова-Смирнова с поправкой Лиллиефорса. Для проверки статистической значимости различий показателей в сравниваемых группах использовали непараметрические критерии Вилкоксона (W) для независимых выборок и Вилкоксона (T) – для зависимых выборок. Различия считались достоверными при уровне значимости $p<0,05$. Критическое значение уровня значимости принималось равным 5 %.

Результаты исследования и их обсуждение. В результате исследования было установлено, что абсолютное и относительное количество лимфоцитов у больных ХГ и АХГ выше, по сравнению с показателями в группе здоровых доноров (табл. 1).

Таблица 1

Содержание лимфоцитов крови у пациентов с Helicobacter pylori-ассоциированными заболеваниями

Группы	**Европеоиды**		**Хакасы**	
	Количество лимфоцитов		***Количество лимфоцитов***	
	Абсолютное, $x10^9$/л	*Относительное, %*	*Абсолютное, $x10^9$/л*	*Относительное, %*
Здоровые доноры	1,9 (1,8–2,2)	26,2 (20,3–27,9)	2,1 (1,7–2,3)	25,5 (21,0–29,0)
Больные хроническим гастритом	2,9 (2,1–3,5)	39,5 (36,2–43,3) [1]	2,5 (2,2–2,8) [1]	46,1 (39,5–53,4) [1]
Больные атрофическим хроническим гастритом	2,5 (2,0–3,2)	34,5 (28,4–42,3) [1]	3,0 (2,4–4,2) [1]	47,8 (34,2–57,1) [1]

Примечание: n – количество обследованных пациентов, [1] – $p<0,05$ – статистическая значимость различий, по сравнению с показателями у здоровых доноров.

При проведении сравнительного межпопуляционного анализа содержания количества лимфоцитов крови у больных ХГ и АХГ статистически значимых различий между хакасами и европеоидами выявлено не было.

В результате исследования апоптотической гибели было показано, что уровень спонтанного апоптоза лимфоцитов крови у больных ХГ и АХГ был выше, по сравнению с группой здоровых доноров (табл. 2). Такая закономерность была характерна как для хакасов, так и для европеоидов. Показатели индуцированного апоптоза превышали значения спонтанного. В группах ХГ и АХГ индуцированный апоптоз был выше, чем в группе контроля. Хотя различия не носили статистически значимого характера. Исключение составило значение индуцированного апоптоза в группе европеоидов больных ХГ (табл. 2).

Таблица 2

Показатели спонтанного и индуцированного перекисью водорода апоптоза лимфоцитов крови у больных Helicobacter pylori-ассоциированными заболеваниями

Группы	**Европеоиды**		**Хакасы**	
	Апоптоз лимфоцитов крови		***Апоптоз лимфоцитов крови***	
	Спонтанный	*Индуцированный*	*Спонтанный*	*Индуцированный*
Здоровые доноры	18,2 (14,7–22,6)	31,7 (24,5–35,8) [2]	16,2 (11,4–18,7)	27,2 (21,3–32,5) [2]
Больные хроническим гастритом	21,1 (17,1–25,0)	30,8 (21,1–34,5)	19,2 (18,8–25,3) [1]	28,9 (24,6–32,7) [2]
Больные атрофическим хроническим гастритом	27,3 (24,1–29,8) [1]	36,4 (22,8–40,1)	24,8 (19,8–29,2) [1]	34,6 (27,3–39,7)

Примечание: [1] – $p<0,05$ – статистическая значимость различий при сравнении показателей со здоровыми донорами; [2] – $p<0,05$ – статистическая значимость различий при сравнении показателей спонтанного и индуцированного апоптоза.

Для оценки степени прироста индуцированного апоптоза нами был рассчитан апоптотический индекс (АИ – отношение спонтанного и индуцированного апоптоза, выраженное в %). При ХГ АИ составил у европеоидов – 45,9 %, у хакасов – 55,4 %, ($p<0,05$). При АХГ у европеоидов – 33,3 %, у хакасов – 39,5 %. У здоровых доноров АИ не имел достоверных отличий у европеоидов, по сравнению с хакасами (74,0 и 67,9 %, соответственно).

Соотношение АИ в группе пациентов с ХГ и АХГ относительно контроля, свидетельствует о наличии проапоптотической активации лимфоцитов крови у пациентов с HP-инфекцией. Вероятно, что дифференциацию отношения апоптоз/пролиферация лимфоцитов крови у пациентов с ХГ и АХГ можно объяснить гетерогенность субтипов HP.

Ряд работ демонстрируют увеличение риска развития атрофического гастрита и рака желудка у пациентов с CagA HP [9, 16].

Изучение распределения генотипов HP у европеоидов показало, что cagA штаммы встречались у пациентов с ХГ (78,3 %) и больных АХГ (83,7 %). У хакасов cagA штаммы HP регистрировались статистически значимо реже у 36,8 % ($\chi^2=36,2$; $p<0,05$) больных ХГ и 43,5 % ($\chi^2=34,5$; $p<0,05$) АХГ. VacA штаммы встречались у 100,0 % больных ХГ и 97,9 % пациентов с АХГ. Среди хакасов VacA штаммы HP встречались встречались реже чем у европеоидов (при ХГ – 92,6 %, $\chi^2=8,3$; $p<0,05$, при АХГ – 86,9 %, $\chi^2=8,7$; $p<0,05$).

Влияние HP на клеточную гибель достаточно разнообразно и связано как с индукцией, так и с ингибированием апоптоза [10, 12, 15, 19]. Известно, что VacA+ HP взаимодействует с иммунной системой, в том числе и за счет модуляции апоптоза эпителиальных и иммунных клеток (эозинофилов, макрофагов и Т-лимфоцитов) [13, 17, 20]. Причем патогенное влияние VacA+ HP на лейкоциты по мнению некоторых авторов, по значимости гораздо выше, чем патогенный эффект в отношении эпителиоцитов [18]. Считается, что даже низкие концентрации VacA+ HP являются достаточными для HP-зависимого увеличения апоптоза клеток [8, 14, 17].

CagA-штаммы вызывают «окислительный взрыв» в фагоцитарных клетках, оказывают непрямое цитотоксическое действие на клетки слизистой оболочки желудка, усиливают Fas-опосредованный апоптоз, способствуют деградации молекулы p53, вовлечены в механизмы Т-клеточной регуляции. Однако наиболее значимым эффектом белка CagA является его канцер-ассоциированная активность. Данный феномен заключается в том, что белок CagA модулирует свой собственный проапоптогенный сигнал [11].

Заключение. Таким образом, патогенез Helicobacter pylori-ассоциированных заболеваний является результирующей взаимодействия макроорганизма и Helicobacter pylori. Обнаруженные закономерности усиления пролиферации лимфоцитов наряду с активацией апоптоза вносят значительный вклад в формирование несостоятельности иммунитета. Выраженность иммунного ответа возрастает с увеличением активности воспалительного процесса у пациентов с хроническим атрофическим и неатрофическим гастритом, так как уменьшение количества иммунных клеток сопряжено с изменениями соотношения субпопуляций лимфоцитов и является одним из проявлений нарушения иммунореактивности. При обследовании двух популяционных групп (хакасов и европеоидов) мы получили однонаправленные изменения соотношения пролиферации и апоптоза. В то же время процесс был более выражен у хакасов, по сравнению с европеоидами. Вероятно, что именно генетические различия Helicobacter pylori являются одной из причин большей распространенности и выраженности атрофического гастрита у европеоидов, по сравнению с хакасами.

Литература:

1. Агеева Е. С. Ассоциация полиморфизмов генов G174C ИЛ-6 и T-251A ИЛ-8 с язвенной болезнью у хакасов / Е. С. Агеева, О. В. Штыгашева, Н. В. Рязанцева // Иммунология. – 2010. - № 3, Т. 31. – С. 131–133.
2. Агеева Е. С. Ассоциация полиморфных маркеров -251 T>A гена IL-8 с язвенной болезнью у хакасов / Е. С. Агеева, О. В. Штыгашева, Н. В. Рязанцева // Молекулярная медицина. – 2011. – № 2. – С. 17–22.
3. Агеева Е. С. Популяционные особенности ассоциации полиморфизма генов интерлейкинов с патологией желудка и двенадцатиперстной кишки у хакасов / Е. С. Агеева, О. В. Штыгашева, Н. В. Рязанцева // Терапевтический архив. – 2011. – Т. 83, № 2. – С. 16–19.
4. Молекулярно-генетические факторы, влияющие на исход инфицирования Helicobacter pylori у жителей Республики Хакасия / Е. С. Агеева [и др.] // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2010. – № 4. – С. 13–18.
5. Штыгашева О.В. Ассоциация cag A и vac A штаммов Helicobacter pylori и язвенной болезни в организованной популяции г. Абакана / О.В. Штыгашева, В.В. Цуканов // Росс. журнал гастроэнтер., гепатологии и колопроктол. – 2004. – № 2. – С. 84-87.
6. Allen R.T. Morphological and Biochemical Characterization and Analysis of Apoptosis / R.T. Allen, W.J. Hunter, D.K. Agrawal // Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. – 1997. –Vol.37, №4. – P. 215–228.
7. Dixon M. F. Histological classification of gastritis and Helicobacter Pylori infection: an agreement at last? The International Workshop on the Histopathology of Gastritis // Helicobacter. – 1997. – Vol. 2. – P. 17–24.
8. Galmiche A. Targeting of Helicobacter pylori VacA to mitochondria / A. Galmiche, J. Rassow // Gut Microbes. – 2010. – Vol. 1 (6). – P. 392-395.
9. Helicobacter pylori and atrophic gastritis: importance of the cagA status / E. J. Kuipers [et al.] // J Natl Cancer Inst. – 1995. – Vol. 87. – P. 1777–1780.
10. Helicobacter pylori CagA phosphorylation status determines the gp130-activated SHP2/ERK and JAK/STAT signal transduction pathways in gastric epithelial cells / I. O. Lee [et al.] // J. Biol. Chem. – 2010. – Vol. 285. – P. 16042–16050. doi: 10.1074/jbc.M110.111054.
11. Helicobacter pylori CagA: from pathogenic mechanisms to its use as an anti-cancer vaccine / M. Stein [et al.] // Frontiers in Immunology. – 2003. - Vol. 4. - P.1-17. doi: 10.3389/ fimmu.2013.00328.

12. Helicobacter pylori cytotoxin-associated gene A activates the signal transducer and activator of transcription 3 pathway in vitro and in vivo / D. M. Bronte-Tinkew [et al.] // Cancer Res. – 2009. – Vol. 69. – P. 632–639. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1191.
13. Helicobacter pylori gamma-glutamyltranspeptidase induces cell cycle arrest at the G1-S phase transition / J. M. Kim [et al.] // The Journal of Microbiology. – 2010. – Vol. 48 (3). – P. 372–377.
14. Inhibition ofprimary human T-cell proliferation by Helicobacter pylori vaculationg toxin (VacA) is independent of VacA effects on IL-2 secretion / M. S. Sundrud [et al.] // Proc. Natl. Sci. USA. – 2004. –Vol. 101. – P. 7727-7732.
15. Lamb A. Role of the *Helicobacter pylori*-induced inflammatory response in the development of gastric cancer / A. Lamb, L. F. Chen // J. Cell Biochem. – 2013. – Vol. 114. – P. 491–497. doi: 10.1002/jcb.243.
16. Meta-analysis of the relationship between cagA seropositivity and gastric cancer / J.Q. Huang [et al.] // Gastroenterology. – 2003. – Vol. 125. – P. 1636–1644.
17. Negative Selection of T Cells by Helicobacter pylori as a Model for Bacterial Strain Selection by Immune Evasion / J. Wang [et al.] // J. Immunol. – 2001. – Vol. 167, № 2. – P. 926-934.
18. Rassow J. Helicobacter pylori vacuolating toxin A and apoptosis // Cell Communication and Signaling. – 2011. –Vol. 26. – P. 1-9. doi: 10/1186/1478-811X-9-26.
19. Rolig A. S. Bacterial chemotaxis modulates host cell apoptosis to establish a T-helper cell, type 17 (Th17)-dominant immune response in Helicobacter pylori infection / A. S. Rolig, J. E. Carter, K. M. Ottemann // Proc Natl Acad Sci USA. – 2011. – Vol. 108 (49). – P. 19749–19754.
20. Suerbaum S. Helicobacter pylori: recombination, population structure and human migration / S. Suerbaum, M. Achtman // International Journal of Medical Microbiology. – 2004. – Vol. 294 (2–3). – P. 133–139.