

ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО И ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ ЯЗВЕННОЙ БОЛЕЗНЬЮ, АССОЦИИРОВАННОЙ С HELICOBACTER PYLORI

А. А. Степченко

Курский государственный медицинский университет

В статье представлены результаты исследования иммунологических показателей у больных язвенной болезнью, ассоциированной с различными штаммами *Helicobacter pylori*. Установлено снижение фагоцитарной активности нейтрофилов и IgG, выявлен дисбаланс субпопуляции Т-лимфоцитов за счет увеличения CD4+, уменьшения CD8+ в сыворотке крови у больных язвенной болезнью, ассоциированной с токсигенным штаммом *Helicobacter pylori*. Отмечено повышение сывороточного уровня провоспалительных цитокинов (фактора некроза опухоли- α , интерлейкина-1 β , интерлейкина-8, интерферона- γ) и противовоспалительных цитокинов (интерлейкина-4, интерлейкина-10, трансформирующего фактора роста β 1), наиболее выраженное у больных язвенной болезнью, ассоциированной с токсигенным штаммом *Helicobacter pylori*.

Ключевые слова: иммунитет, язвенная болезнь желудка, ассоциации, воспаление.

Проблема воспалительных и эрозивно-язвенных заболеваний гастродуоденальной зоны актуальна уже много лет. Важность ее обусловлена как высокой распространенностью эрозивно-язвенных и воспалительных заболеваний желудка и двенадцатиперстной кишки (ДПК), так и частотой хеликобактериоза – заболевания, вызванного *Helicobacter pylori* (НР) [3, 7]. Так, частота язвенной болезни (ЯБ) желудка и ДПК у населения разных стран и у разных категорий населения достигает 10,0-25,0% [12, 13]. Доказано, что НР может не вызывать изменений слизистой оболочки желудка, но является основным этиологическим фактором хронического гастрита и ЯБ. Кроме того, НР является одной из причин рака желудка (60-70%), а также инициирует развитие полиповидных образований слизистой оболочки желудка [1].

В связи с быстрым развитием учения о важной роли иммунной системы в формировании большинства хронических заболеваний внутренних органов, наши представления о патогенезе болезней желудочно-кишечного тракта и, в частности, язвенной болезни – значительно расширились. В настоящее время большинством исследователей признается роль иммунной системы в патогенезе ЯБ. Тем не менее, результаты изучения функционального состояния системы иммунитета при этом заболевании достаточно противоречивы [3, 6, 7, 10, 11]. Сдвиг иммунных показателей может служить маркером благополучного или неблагополучного состояния, а также критерием эффективности проводимой терапии, что делает актуальным и практически значимым изучение нарушений в клеточном и гуморальном звене им-

мунитета, что позволит определить предикторы неблагоприятного течения ЯБ, позволит оптимизировать методы терапии, улучшить прогноз и качество жизни пациентов [11].

Целью исследования явилось изучение фагоцитарной активности нейтрофилов, популяционного спектра лимфоцитов периферической крови, сывороточной концентрации иммуноглобулинов А, М, G (IgA, M, G), провоспалительных цитокинов (фактора некроза опухоли- α (ФНО- α), интерлейкина-1 β (ИЛ-1 β), интерлейкина-8 (ИЛ-8), интерферона- γ (ИФН- γ)) и цитокинов противовоспалительного действия (интерлейкина-4 (ИЛ-4), интерлейкина – 10 (ИЛ-10), трансформирующего фактора роста β 1 (ТФР- β 1)) у больных язвенной болезнью.

Материалы и методы

Обследовано 135 больных язвенной болезнью с локализацией язвы в луковице двенадцатиперстной кишке (ЯБДПК) в возрасте от 17 до 48 лет (средний возраст $32,5 \pm 15,5$ лет), из них - 87 мужчин и 48 женщин. Длительность течения язвенной болезни колебалась от 6 мес. до 15 лет. По данным ФГДС размер язвенного дефекта в среднем составил $1,5 \pm 0,15$ см.

Диагноз язвенной болезни устанавливался на основании жалоб, анамнеза, объективных данных, рН-метрии, фиброгастроуденоскопии с визуальной оценкой слизистой оболочки и прицельная биопсия (не менее 3-4-х биоптатов) из измененных участков слизистой оболочки антрального отдела желудка, луковицы двенадцатиперстной кишки, из эрозий, краев язвы.

Биохимические и функциональные методы исследования проводились по общепринятым методикам, что позволило оценить функцию различных органов, выявить осложнения и сопутствующие заболевания.

Критериями исключения пациентов из исследования являлись: язвенный процесс в желудке и двенадцатиперстной кишке, связанный с приемом НПВС и гастринотомии; наличие сосудистого генеза язвообразования (атеросклероз, узелковый периартериит); наличие осложнений язвенной болезни тяжелой степени (рубцовая деформация III ст. с нарушением эвакуаторной функции, пенетрация язвы, малигнизация, рецидивы кровотечения, которые могли потребовать хирургической коррекции; проведенные хирургические операции на ЖКТ, поджелудочной железе, печени и ее воротах, которые могут влиять на секреторную и моторную функцию желудка (хирургическое лечение грыжи пищеводного отверстия диафрагмы, ваготомии, экономные резекции, холецистэктомии и т.д.).

Наличие НР в биоптатах определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), направленной на нахождение ДНК банального штамма НР, а также локусов ДНК токсигенного штамма (*saqA+*, *vacA+*) (тест-наборы на банальный и токсигенный штамм НР научно-производственной фирмы «ДНК-технология»).

Обследуемый контингент был разделен на четыре группы: 1 группа - контрольная - составила 20 условно здоровых человека без жалоб со стороны ЖКТ, без диспепсических явлений, сопоставимые по полу и возрасту с основной группой больных и отсутствием НР по данным ПЦР, 2 группа – 18 пациентов ЯБ, у которых НР не обнаружена, 3 группа – 53 больных ЯБ, у которых выявлен «банальный» НР, не обладающий токсигенными свойствами, 4 группа – 64 человек, страдающих ЯБ, ассоциированной с токсигенным штаммом НР.

Подсчет лейкоформулы проводился при микроскопии мазков крови, окрашенных по Романовскому-Гимзе. Лизосомальная активность нейтрофилов оценивалась по интенсивности люминесценции лизосом в цитоплазме фагоцита, окра-

шенных акридиновым оранжевым (Фрейдлин И.С., 1984). При исследовании фагоцитарной активности нейтрофилов крови на модели поглощения частиц латекса (Фрейдлин И.С., Немировский С.В., Рудакова Т.А., 1976), определялись фагоцитарный индекс и фагоцитарное число. Исследование внутриклеточного кислород-зависимого метаболизма проводили, используя НСТ-тест. Метод основан на учете интенсивности восстановления клетками нитрасинего тетразолия (НТС) в его нерастворимую форму – диформаза в результате респираторного взрыва в активированных фагоцитах. Концентрацию иммуноглобулинов класса А, М, G в сыворотке крови определяли по общепринятой методике (Mancini G. et al., 1965) в модификации А.А.Тихомирова (1977). Для определения уровня про- и противовоспалительных цитокинов (ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-8, ИФН- γ , ИЛ-4, ИЛ-10) были использованы соответствующие тест-системы для иммуноферментного анализа, произведенные ООО «Цитокин» (Россия, г. Санкт-Петербург). ТФР- β 1 определяли иммуноферментным методом (Amersham Pharmacia Biotech). Исследование субпопуляций лимфоцитов проводилось по методике иммунофенотипирования лимфоцитов в модификации С.В.Сибиряк (1997) с использованием моноклональных антител НПЦ «МедБиоСпектр» (Россия, Москва).

Статистическая обработка цифровых данных произведена с применением стандартного пакета прикладных программ Microsoft Excel и Statistica 6,0 for Windows.

Результаты и обсуждения

При оценке функциональной активности нейтрофилов периферической крови больных ЯБ отмечено значительное снижение показателей фагоцитоза во всех обследуемых группах в сравнении с контрольной группой, причем более низкий уровень фагоцитарного индекса и фагоцитарного числа, достоверное повышение спонтанного НСТ-теста нейтрофилов отмечены в группе больных ЯБ, ассоциированной с токсигенным штаммом НР (табл. 1).

Таблица 1

Функциональная активность нейтрофилов периферической крови больных язвенной болезнью.

	Группа контроля	Больные ЯБДПК		
		НР –	НР + (банальный штамм)	НР + (токсигенный штамм)
	n=20	n=18	n=53	N=64
	1	2	3	4
Фагоцитарный индекс, %	57,6 \pm 1,6	46,7 \pm 3,8	40,8 \pm 4,2* ¹	33,4 \pm 2,6* ¹
Фагоцитарное число, усл. ед.	1,24 \pm 0,01	1,23 \pm 0,1	1,17 \pm 0,14	0,92 \pm 0,03* ^{1,2}
Спонтанный НСТ-тест активность, %	27,9 \pm 2,4	32,5 \pm 4,4	39,6 \pm 2,9	43,6 \pm 3,5* ¹

* - p<0,05

Результаты исследования популяционного спектра лимфоцитов периферической крови больных ЯБ, ассоциированной с различными штаммами НР, представлены в таблице 2.

Таблица 2

**Показатели клеточного звена иммунитета в периферической крови
больных язвенной болезнью.**

Группы обследованных		N	Поверхностные маркеры		
			CD4+	CD8+	CD4/CD8
Контроль	1	20	46,2±1,3	20,8±0,5	2,3±0,5
Больные ЯБ НР –	2	18	42,27±1,2	22,6±0,5	2,33±0,03
Больные ЯБ НР + (банальный штамм)	3	53	44,26±2,4	28,4±1,2* ^{1,2}	2,2±0,02
Больные ЯБ НР + (токсигенный штамм)	4	69	34,4±1,2* ¹	32,4±1,2* ^{1,2,3}	1,49±0,03* ^{1,2,3}

* - $p < 0,05$

Как видно из приведенных данных, показатели клеточного иммунитета у больных ЯБ значительно отличаются от аналогичных в группе контроля. При сравнении популяций и субпопуляций лимфоцитов периферической крови больных ЯБ, без персистенции НР и больных ЯБ, инфицированных банальным штаммом НР, выявлено достоверное уменьшение содержания CD8+ клеток при одновременном увеличении субпопуляции CD4+ положительных клеток у больных ЯБ, ассоциированной с банальным штаммом НР. Степень дисбаланса субпопуляции Т-лимфоцитов была достоверно выше у больных ЯБ, ассоциированной с токсигенным штаммом НР ($p < 0,05$) в сравнении с аналогичными показателями больных ЯБ, ассоциированной с банальным штаммом НР, что указывает на более глубокие изменения реактивности у данной категории больных и подтверждает расбалансировку в системе CD4/CD8.

Концентрация IgA и IgM в сыворотке крови у больных ЯБ во всех обследованных группах не отличалась от группы контроля ($p > 0,05$). Выявлена тенденция к снижению уровня IgG в сыворотке крови больных ЯБ по сравнению с группой контроля (Ig G – 12,4±0,2 г/л). Особенно четко это прослеживается у больных ЯБ, ассоциированной с хеликобактерной инфекцией. Так, в группе больных ЯБ, ассоциированной с токсигенным штаммом НР, содержание IgG было 1,4 раза ниже, чем при ЯБ ассоциированной с банальным штаммом НР ($p > 0,05$) и на 46% меньше, чем у пациентов ЯБ без персистенции НР ($p < 0,05$).

Учитывая то, что цитокиновый профиль крови отражает активность воспаления, изменения содержания цитокинов в сыворотке крови являются маркерами как степени активности заболевания органов пищеварения, так и результатов лечения [10], проведена оценка содержания провоспалительных цитокинов (ИЛ-8, ФНО- α , ИЛ-1 β , ИФН- γ) в сыворотке крови больных ЯБ, ассоциированной с различными штаммами НР.

Показано достоверное повышение концентрации провоспалительных цитокинов (ИЛ-8, ФНО- α , ИЛ-1 β , ИФН- γ) в сыворотке крови больных ЯБ, инфицированных банальным штаммом НР, по сравнению с группой контроля и больными ЯБ, не ассоциированной с НР ($p < 0,05$). Наиболее высокий уровень изучаемых ци-

токинов определен у больных ЯБ, ассоциированной с токсигенным штаммом НР ($p < 0,05$).

Известно, что НР обладает относительно низкой иммуногенностью и обуславливает длительное взаимодействие микроорганизма с иммунной системой слизистых оболочек и персистенцию инфекции, но способность индуцировать воспалительный ответ у разных штаммов НР различно и во многом определяется их стимулирующим влиянием на выработку эпителиальными клетками различных цитокинов [6]. НР стимулирует продукцию желудочным эпителием и активированными макрофагами провоспалительного цитокина – ИЛ-8. Исследования показали, что уровень ИЛ-8 в сыворотке крови у больных ЯБ без персистенции НР был в 1,6 больше в сравнении с контролем ($8,8 \pm 2,4$ пг/л).

У больных ЯБ, ассоциированной с токсигенным штаммом НР содержание ИЛ-8 в сыворотке крови составило $70,4 \pm 2,4$ пг/мл, что было на 25,6% и 65,1% соответственно выше, в сравнении с аналогичными показателями у больных ЯБ без персистенции НР и пациентами ЯБ, ассоциированной с банальным штаммом НР ($p < 0,05$). Данная ситуация объясняется тем, что ИЛ-8 является не только хемоаттрактантом для нейтрофилов, но и может активировать клетки в очаге воспаления, усиливая адгезию и дегрануляцию нейтрофилов, активируя выброс супероксидных радикалов и фагоцитоз [2, 9].

Кроме ИЛ-8, макрофаги и моноциты секретируют и другие медиаторы межклеточных взаимодействий, играя важную роль в развитии системного иммунного ответа, воспалительных изменений гастродуоденальной слизистой оболочки и регенерации.

При определении концентрации ИЛ-1 β , ФНО- α , ИНФ- γ выявлены следующие изменения: содержание ИЛ-1 β в группе пациентов ЯБ, ассоциированной токсигенным штаммом НР, было на 35,8%, ФНО- α на 35,7%, ИНФ- γ на 23% выше, чем при обнаружении банального штамма НР ($p < 0,05$), ИЛ-1 β в 2,4 раза, ФНО- α в 3,3 раза, ИНФ- γ в 1,8 раза выше ($p < 0,05$), чем в группе больных ЯБ, не ассоциированной с НР, и соответственно ИЛ-1 β на 70%, ФНО- α на 91%, ИНФ- γ на 46,7% выше, в сравнении с группой контроля (ИЛ-1 β – $35,4 \pm 4,1$ пг/мл, ФНО- α – $32,4 \pm 3,6$ пг/мл, ИНФ- γ – $9,8 \pm 1,2$ пг/мл).

ИНФ- γ синтезируется Т-лимфоцитами 1-го типа и играет главную роль в качестве макрофаг-активирующего фактора, стимулятора функциональной активности Т-лимфоцитов киллеров и НК-клеток. ФНО- α является сильнейшим стимулом для продукции ИЛ-1 β , являющегося главным как медиатор развития местной воспалительной реакции в сосудистой стенке, так и острофазового ответа на уровне организма. ИЛ-1 β синтезируется макрофагами и моноцитами, а также клетками сосудистого эндотелия. ИЛ-1 β проявляет широкий спектр локальных и системных эффектов, к которым относятся: активация Т- и В- лимфоцитов, индукция синтеза молекул адгезии и ИЛ-8 [8, 9].

Таким образом, провоспалительная цитокинемия поддерживает интенсивность клеточного ответа на бактериальную обсемененность у больных язвенной болезнью.

Цитокины составляет сеть взаимодействий в организме с большим количеством прямых и обратных связей. Цитокиновая сеть является саморегулирующейся системой, нарушение в которой приводит к избыточному или недостаточному синтезу определенных цитокинов, что в свою очередь может приводить к развитию разнообразных патологических процессов, составляющих основу широкого спектра

заболеваний человека [8, 9]. Сравнительная оценка уровня ИЛ-4 у больных ЯБ без НР и в группе контроля, показало достоверно более высокий уровень ИЛ-4 в группе больных ЯБ ($34,8 \pm 2,6$ пг/мл и $22,4 \pm 1,2$ пг/мл соответственно, $p < 0,05$). Максимальная концентрация ИЛ-4 в сыворотке крови больных ЯБ определена в группе больных ЯБ, ассоциированной с токсигенным штаммом НР, осложненным течением ЯБ, при длительности заболевания более 10 лет ($68,4 \pm 5,2$ пг/мл, $p < 0,05$). Каскадный характер действия цитокинов объясняется тем, что один цитокин влияет на продукцию другого [4]. ИЛ-4 обладает способностью ингибировать продукцию цитокинов мононуклеарного происхождения ИЛ-1 β и ФНО- α и цитотоксичность макрофагов [5]. Вероятно повышение уровня ИЛ-4, в данной ситуации, носит компенсаторный характер по отношению к провоспалительным цитокинам и выступает в качестве фактора, стабилизирующего течение заболевания, что нашло подтверждение при проведении корреляционного анализа, показавшего наличие прямой корреляционной зависимости между ИЛ-4 и ИЛ-1 β ($r = 0,68$, $p < 0,01$), ИЛ-4 и ФНО- α ($r = 0,54$, $p < 0,05$).

Таким образом, у больных ЯБ имеет место увеличение сывороточной концентрации провоспалительных цитокинов ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-8, ИФН- γ и цитокинов противовоспалительного действия (ИЛ-4, ИЛ-10 и ТФР- β 1). Наибольший уровень ИЛ-10 ($22,4 \pm 2,2$ пг/мл) отмечен у больных ЯБ, ассоциированной с токсигенным штаммом НР. Эта величина в 1,8 раза превышала величину контрольной группы и 1,3 раза аналогичный показатель у больных ЯБ, ассоциированной с банальным штаммом НР.

Наибольшее содержание ТФР- β 1 отмечено у больных ЯБ, ассоциированной с токсигенным штаммом НР ($78,4 \pm 6,9$ пг/мл, $p < 0,05$). Повышение уровня ТФР- β 1 у больных ЯБ, ассоциированной с токсигенным штаммом НР, следует рассматривать как адаптивную реакцию, направленную на защиту клеток от апоптоза и уменьшению активности таких провоспалительных цитокинов, как ФНО- α и ИЛ-8. Установлена положительная корреляция между ТФР- β 1 и ФНО- α ($r = 0,78$, $p < 0,01$), ТФР- β 1 и ИЛ-8 ($r = 0,74$, $p < 0,01$).

Выводы

Таким образом, выявленные нарушения в цитокиновом статусе, клеточном и гуморальном звене иммунитета свидетельствуют о значимости иммунных нарушений у больных ЯБ, ассоциированной с хеликобактерной инфекцией. Наиболее выраженные иммунные нарушения зарегистрированы у больных ЯБ, ассоциированной с токсигенным штаммом НР.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авраменко, А.А. Хеликобактериоз/ А.А.Авраменко, А.И.Гоженко. – Одесса: Фотосинтетика, 2004. – 326 с.
2. Демьянов, А.В. Диагностическая ценность исследования уровней цитокинов в клинической практике / А.В.Демьянов, А.Ю.Котов, А.С.Симбирцев//Цитокины и воспаление. – 2003. – №3. – С. 20-35
3. Калинин, А.В. Язвенная болезнь: метод. указания//А.В.Калинин – М.: ГИУВ МО РФ, 2004. – 64 с.
4. Кетлинский, С.А. Цитокины и их агонисты: теория и практика/С.А.Кетлинский, А.М.Ищенко//Мед. иммунология. – 1999. – Т.1, №3-4. - С.16.

5. Кетлинский, С.А. Цитокины мононуклеарных фагоцитов в регуляции реакции воспаления и иммунитета / С.А.Кетлинский, Н.М.Калинина// Иммунология. – 2000. - №3. - С.30-44.
6. Кондрашова, Э.А. Хронический гастрит и язвенная болезнь/ Э.А.Кондрашова, Н.М.Калинина, Н.И.Давыдова, А.Ю.Барановский, А.С.Кондрашин // Цитокины и воспаление. – 2002. - №4. Режим доступа: <http://www.cytokines.ru/russian/2002/4/Art1.php>, свободный.
7. Передерий, В.Г. Язвенная болезнь: прошлое, настоящее, будущее/ В.Г.Передерий, С.М.Ткач, С.В.Скопиченко. – К.: Б.И., 2003. – 256 с.
8. Потапнев, М.П. Апоптоз клеток иммунной системы и его регуляция/М.П.Потапнев//Иммунология. – 2002. - №4. – С. 237-245.
9. Симбирцев, А.М. Цитокины – новая система регуляции защитных реакций организма / А.С.Симбирцев // Цитокины и воспаление. – 2002. – Т.1, №1. –С. 9-16.
10. Царегородцева, Т.М. Цитокины в гастроэнтерологии/Т.М.Царегородцева, Т.И.Серова. – М.: Анахарсис, 2003. – 96 с.
11. Циммерман, Я.С. Helicobacter pylori и их роль в развитии хронического гастрита и язвенной болезни/ Я.С.Циммерман, М.Р.Зиннатулин // Клиническая медицина. – 1997. - №4. – С. 8-13.
12. Helicobacter pylori infection in symptomatic and asymptomatic children and adolescent in Czech republic/ V.Volf, M.Sedlackova, D.Marx et al.//Gut. – 2004. – Suppl.53, N6.- P.A201-202.
13. Kimura, S. Prevalence of Helicobacter pylori infection in hemorrhagic erosive gastroduodenitis causing upper gastrointestinal bleeding/ S. Kimura, M. Tanaka//Gut. – 2004.- Suppl.53, N6.- P.A201.

THE ACTIVITIES OF CELLULAR AND HUMORAL IMMUNITY IN THE PATIENTS WITH PEPTIC ULCER, ASSOCIATED WITH HELICOBACTER PYLORI

A.A. Stepchenko

The article are presented results study of some immunological activities in the patients with peptic ulcer associated with different culture of Helicobacter pylori. They are established the reduction of phagocytic activity of neutrofiles and IgG, disbalances of subpopulation of T-lymphocytes (increasing CD4+ and decreasing CD8+) in blood of the patients with peptic ulcer associated with toxigenic culture of Helicobacter pylori. It is revealed the increasing of level of proinflammatory cytokines (TNF α , IL-1 β , IL-8 and INF γ) and antiinflammatory cytokines IL-4, IL-10, transformed growth factor β 1 (TGF- β 1) strongly pronounced at the patients with peptic ulcer associated with toxigenic culture of Helicobacter pylori.