

Е.Г. Поморгайло¹, А.В. Кононов¹ и Е.А. Потрохова²

РЕАКТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА ЧЕЛОВЕКА ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ *HELICOBACTER PYLORI* В АСПЕКТЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА

¹ Кафедра патологической анатомии с курсом клинической патологии (зав. — проф. А.В. Кононов) и ² кафедры детских болезней № 2 (зав. — проф. Н.В. Соболюк), Омская государственная медицинская академия, e-mail: elenarom@bk.ru

Цель исследования — определить морфологические изменения слизистой оболочки желудка человека при инфицировании *Helicobacter pylori* (HP) в зависимости от полиморфизма генов, кодирующих и интерлейкин-1 β , и антагонист рецептора интерлейкина-1. Обследовано 106 подростков с хроническим гастритом, инфицированных HP, и 44 подростка с гастритом, не связанным с HP. У больных с HP-ассоциированным гастритом отмечено значимое увеличение индексов пролиферации и апоптоза эпителия по сравнению с контрольной группой. Зона пролиферации эпителия расширялась в сторону покровно-ямочного эпителия и вглубь желез, отмечалась отчетливо выраженная микроплазмодитарная инфильтрация собственной пластинки слизистой оболочки. Полиморфизм генов цитокинов определяли с помощью полимеразной цепной реакции. Полученные данные указывают на ассоциацию более выраженного воспаления слизистой оболочки желудка с аллелем T ($\chi^2 = 14,006$; $P = 0,001$) полиморфного локуса -511 C>T гена интерлейкина-1 β . Влияния аллелей полиморфных локусов +3953 C>T гена интерлейкина-1 β и переменного числа tandemных повторов во 2-м интроне гена антагониста рецептора интерлейкина-1 на морфологические изменения в слизистой оболочке желудка не выявлено.

Ключевые слова: желудок, слизистая оболочка, *Helicobacter pylori*, цитокины, генетический полиморфизм

Реактивные изменения слизистой оболочки желудка при инфицировании человека *Helicobacter pylori* (HP) характеризуются комплексом реакций, основными из которых являются изменение процессов клеточного обновления эпителиоцитов и воспалительная реакция в собственной пластинке слизистой оболочки.

Воспалительная реакция стимулируется как непосредственно HP, выделяющим нейтрофил-активирующий белок, так и опосредованно — посредством усиления секреции различных цитокинов. Ключевую роль в цитокиновом каскаде при HP-инфекции играет семейство интерлейкина-1 (ИЛ-1) [10]. Количество выделяемых клеткой цитокинов зависит от полиморфизма их генов. В гене ИЛ-1 β описаны три полиморфизма — -31 T>C, -511 C>T и +3953 C>T, а в гене антагониста рецептора ИЛ-1 (ИЛ-1RN) 5 аллелей с различным числом tandemных повторов (variable number of tandem repeats — VNTR) во 2-м интроне [8].

В ряде исследований показано, что полиморфизм генов ИЛ-1 β и ИЛ-1RN определяет особенности морфологических изменений в слизистой оболочке желудка. Однако эти данные противоречивы. Одни авторы описывают связь полиморфизма этих генов с развитием хронического воспаления и атрофии желез слизистой оболочки желудка, а также рака желудка [7–9]. Другие исследователи говорят об отсутствии такой ассоциации

[11]. В России исследования полиморфизма генов цитокинов и их связи с HP-ассоциированными заболеваниями единичны [2, 5].

Цель настоящей работы — изучить морфологические изменения слизистой оболочки желудка человека при инфицировании HP в зависимости от полиморфизма генов, кодирующих ИЛ-1 β и ИЛ-1RN.

Материал и методы. Обследовано 106 подростков (45 мальчиков и 61 девочка) с хроническим гастритом, инфицированных HP. Средний возраст больных — 14,3 года, средняя длительность заболевания — 3,5 лет. Контрольная группа включала 44 подростка, не инфицированных HP. Средний возраст и пол подростков в контрольной группе соответствовали основной. Исследование одобрено Локальным комитетом по этике. HP-инфекция диагностирована с использованием трех методов: быстрого уреазного Helpil-теста (Сингана СМ, Россия), гистобактериоскопического (метод Гимзы) и полимеразной цепной реакции (ПЦР) (НПФ Литех, Россия).

Всем подросткам проводили фиброгастродуоденоскопию с биопсией слизистой оболочки антрального отдела желудка. Полученные фрагменты фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, заливали в парафин и окрашивали гематоксилином–эозином. Биоптаты оценивали согласно модифицированной Сиднейской системе. Оценку степени выраженности морфологических признаков проводили по визуально-аналоговой шкале [1].

Для определения пролиферации (маркер Ki67) и апоптоза (маркер CPP32) эпителия проводили иммуногистохимическое исследование (сыворотки фирм DAKO, Дания и Novocastra, Великобритания соответственно) на парафиновых срезах с применением стрептавидин-биотинового метода (визуа-

лизирующая система LSAB2 Systems, пероксидаза хрена, DAKO, Дания). В препаратах при 400-кратном увеличении микроскопа определяли индексы пролиферации и апоптоза как долю положительно окрашенных ядер эпителиоцитов слизистой оболочки желудка в 5 случайно выбранных полях зрения (≥ 500 клеток).

Для генетического исследования брали венозную кровь. Изучали полиморфизм гена ИЛ-1 β -511 C>T и +3953 C>T и гена ИЛ-1RN VNTR во 2-м интроне. В гене ИЛ-1RN определяли 5 аллелей с различным числом tandemных повторов — 2R, 3R, 4R, 5R, 6R. Исследование проводили с помощью ПЦР на амплификаторе «Терцик» (ДНК-Технология, Россия). Метод выделения ДНК и структура праймеров описаны ранее [4].

С помощью сетки Автандилова анализировали плотность клеточного инфильтрата собственной пластинки слизистой оболочки желудка, определяли его объемную долю, клеточный состав и содержание внутриэпителиальных лимфоцитов.

Статистическую обработку данных проводили при помощи углового преобразования Фишера и χ^2 . Силу ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов (odds ratio, OR). Для корреляционного анализа степени связи между двумя переменными использовали ранговый коэффициент корреляции Спирмена (r). Распределение частот встречаемости аллелей генов ИЛ-1 β и ИЛ-1RN соответствовало закону Харди — Вайнберга.

Результаты исследования. В биоптатах слизистой оболочки антрального отдела желудка у больных, инфицированных НР, плотность клеточного инфильтрата собственной пластинки составляла 3132 ± 412 клеток на 1 мм^2 слизистой оболочки, что значимо выше, чем у подростков, неинфицированных НР — 1822 ± 312 клеток ($P < 0,05$). Воспалительный инфильтрат располагался диффузно по всей протяженности собственной пластики слизистой оболочки желудка, тогда как у неинфицированных пациентов иммунокомпетентные клетки определялись лишь в поверхностных отделах. У инфицированных подростков в составе воспалительного инфильтрата количество лимфоцитов и плазматических клеток, эозинофилов, нейтрофилов и количество межэпителиоцитарных лимфоцитов было больше, чем у неинфицированных детей. По данным морфометрического исследования, в собственной пластинке слизистой оболочки преобладали лимфоциты (44,1–46,5%) и плазматические клетки (33,8–37,0%), остальные клетки были представлены нейтрофилами (6,0–6,5%), макрофагами (3,1–3,9%), эозинофилами (7,9–8,3%) и фибробластами (5,1–5,8%). Кроме того, в биоптатах у подростков, инфицированных НР, отмечалась более выраженная лимфоцитарная инфильтрация эпителия слизистой оболочки антрального отдела желудка, чем у неинфицированных ($P < 0,001$). При этом наблюдалось снижение миграции лимфоцитов в поверхностный эпителий при одновременном нарастании их количества в шеечных отде-

лах желез. Объемная доля внутриэпителиальных лимфоцитов в этих отделах составляла $6,3 \pm 0,2$ и $11,7 \pm 0,9\%$ соответственно. У подавляющего большинства больных подростков (57%) степень воспаления оценивалась полуколичественным методом как умеренная, у 27% — воспалительный инфильтрат был слабо выражен, у 16% — определялся отчетливо выраженный воспалительный ответ. У инфицированных подростков в биоптатах слизистой оболочки обнаруживались лимфоидные узелки, в большинстве случаев с герминативными центрами.

В биоптатах слизистой оболочки желудка у больных, инфицированных НР, отмечалось значимое увеличение индексов пролиферации и апоптоза в 1,5–2,5 раза по сравнению с их величинами у неинфицированных подростков. У носителей НР-инфекции по сравнению с неинфицированными пациентами индекс пролиферации составил 28,6 и 20,3% ($P < 0,05$), а индекс апоптоза — 14,4 и 6,4% соответственно ($P < 0,05$).

У инфицированных подростков наблюдалось расширение зоны пролиферации в сторону покровно-ямочного эпителия и в глубокие отделы желез. При исследовании апоптоза меченные CRR32 клетки также выявлялись в покровно-ямочном эпителии и в глубине желез.

Анализ корреляционных связей между параметрами клеточного обновления эпителиоцитов и интенсивностью воспалительного ответа в собственной пластинке слизистой оболочки желудка у подростков, инфицированных НР, выявил положительную корреляционную связь между числом Ki67- и CRR32-позитивных клеток и уровнем воспалительной реакции в слизистой оболочке желудка ($r = 0,56$ и $r = 0,52$ соответственно).

При сопоставлении данных морфологического и генетического исследований обнаружено, что в собственной пластинке слизистой оболочки желудка воспалительная реакция слабой степени определялась значимо чаще у носителей генотипа C/C гена ИЛ-1 β (C -511 T) ($\chi^2 = 10,165$; $P = 0,001$), умеренная степень инфильтрации мононуклеарными клетками — у носителей генотипа C/T ($\chi^2 = 22,243$; $P = 0,001$), тогда как отчетливо выраженный воспалительный инфильтрат имели преимущественно больные — носители генотипа T/T ($\chi^2 = 19,260$; $P = 0,001$). Кроме того, воспаление слизистой оболочки статистически значимо чаще определялось у подростков с аллелем T, чем у больных носителей аллеля C ($\chi^2 = 4,041$; $P = 0,044$), что позволяет говорить об ассоциации аллеля T с более тяжелым течением хронического гастрита (OR=3,2088; CI=1,21–8,52).

В то же время, другой полиморфизм гена ИЛ-1 β (С +3953 Т) не был ассоциирован со степенью выраженности воспалительного ответа в собственной пластинке слизистой оболочки желудка. У большинства пациентов — носителей аллелей и С, и Т отмечалась умеренная воспалительная инфильтрация собственной пластинки (56 и 61% соответственно).

Кроме того, не выявлено ассоциаций и аллелей полиморфного локуса гена ИЛ-1RN с интенсивностью воспалительного ответа. У большинства больных — носителей аллеля 4R и 2R обнаруживалась умеренная инфильтрация иммунокомпетентными клетками слизистой оболочки желудка (58 и 66% соответственно).

Обсуждение полученных данных. Бактерия НР, воздействуя на слизистую оболочку желудка человека, вызывает в ней нарушение клеточного обновления, ускоряя процессы апоптоза и пролиферации эпителиоцитов в 1,5–2,0 раза. Механизмы такого влияния бактерий хорошо изучены и описаны в литературе [13].

В то же время, при инфицировании НР в собственной пластинке слизистой оболочки желудка возникает хроническое воспаление [3], которое, по данным некоторых авторов, в значительной степени влияет на регенерационный гистогенез [13]. Косвенным подтверждением этого факта являются полученные нами данные о положительной корреляционной связи между параметрами клеточного обновления эпителиоцитов и степенью выраженности воспаления в слизистой оболочке желудка.

Среди многочисленных медиаторов воспаления, особенно вызванного грамотрицательными бактериями, важную роль играют провоспалительные цитокины — фактор некроза опухолей- α (ФНО- α) и ИЛ-1. Они индуцируют различные биологические эффекты: играют важную роль в защите против инфекционного агента, их действие способствует процессам регенерации слизистой оболочки желудка, включая пролиферацию клеток, их дифференцировку и апоптоз [6].

Показано, что цитокины в слизистой оболочке желудка инфицированных НР больных индуцируют апоптоз эпителиоцитов через систему FasL/FasR [14].

Эффект воздействия цитокинов на эпителий слизистой оболочки желудка зависит не только от степени ее вовлечения в воспалительный процесс, но и от уровня продукции цитокинов клетками воспалительного инфильтрата. Таким образом, логично предположить, что выработка большего количества ИЛ-1 β приведет к более выраженному воспалительному ответу и к нарушению клеточ-

ного обновления эпителиоцитов в слизистой оболочке желудка.

Уровни ИЛ-1 β зависят от полиморфизма его гена. Ген ИЛ-1 β , кодирующий ИЛ-1 β , — высоко полиморфный. Однако наиболее значимыми являются полиморфизмы –511 С>Т и +3953 С>Т, которые связаны с увеличением секреции цитокина *in vitro* [8]. По данным нашего исследования, среди больных с НР-ассоциированным хроническим гастритом именно у носителей аллеля Т гена ИЛ-1 β (С –511 Т) определялся более выраженный воспалительный инфильтрат в собственной пластинке слизистой оболочки желудка. При этом ассоциации полиморфизма гена ИЛ-1 β (С +3953 Т) и морфологических изменений в слизистой оболочке желудка обнаружено не было.

В сложном каскаде воспалительного процесса участвует ИЛ-1RN. Он относится к противовоспалительным цитокинам, так как конкурентно связывается с рецептором ИЛ-1 β на клетках-мишенях и, тем самым, регулирует действие ИЛ-1 β . Его ген также полиморфен. Носительство аллеля 2R повышает риск развития хронического гастрита, например, у индийцев [7], а также связано с более выраженным воспалением слизистой оболочки желудка [12] и риском развития рака желудка у европейцев [9]. Однако мы не обнаружили ассоциации полиморфизма гена ИЛ-1RN*2 с интенсивностью воспалительного ответа в слизистой оболочке желудка у больных с НР-ассоциированным хроническим гастритом.

Настоящее исследование показало, что у больных, инфицированных НР, отчетливо выраженный воспалительный инфильтрат из мононуклеарных клеток в собственной пластинке слизистой оболочки желудка определяется чаще у носителей аллеля Т полиморфного локуса С –511 Т гена ИЛ-1 β . Вероятно, носительство этого аллеля можно рассматривать как фактор риска развития и продолжительного воспалительного ответа, что приводит к более значительному нарушению клеточного обновления эпителиоцитов слизистой оболочки желудка. Влияния полиморфизма генов ИЛ-1 β (С +3953 Т) и ИЛ-1RN (VNTR во 2-м интроне) на морфологические особенности строения слизистой оболочки желудка не обнаружено.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аруин Л.И., Капуллер Л.Л. и Исаков В.А. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника. М., Трида-Х, 1998.
2. Иванов В.П., Полоников А.В., Хорошая И.В. и др. Связь полиморфизма –511С/Т в промоторной области гена интерлейкина-1 β с предрасположенностью к язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки и особенностями ее

- течения. Рос. журн. гастроэнтерол. гепатол. колопрокт., 2006, № 1, с. 42–46.
3. Кононов А.В. Генетическая регуляция и фенотип воспаления при *Helicobacter pylori*-инфекции. Арх. пат., 2009, т. 71, № 5, с. 57–63.
 4. Кононов А.В., Поморгайло Е.Г., Филипенко М.Л. и др. Полиморфизм генов IL-1 β , антагониста его рецепторов и фенотип воспалительной реакции слизистой оболочки желудка при хеликобактерной инфекции. Молекул. медицина, 2010, № 1, с. 42–45.
 5. Маев И.В., Момыналиев К.Т., Говорун В.М. и др. Эффективность эрадикации *Helicobacter pylori* у больных язвенной болезнью в зависимости от полиморфизма гена ИЛ-1 β –511. Рос. журн. гастроэнтерол. гепатол. колопрокт., 2008, № 6, с. 27–32.
 6. Пальцев М.А., Иванов А.А. и Северин С.Е. Межклеточные взаимодействия. М., Медицина, 2003.
 7. Achyut B.R., Moorchung N. and Mittal B. Genetic association of interleukin-1 haplotypes with gastritis and precancerous lesions in North Indians. Clin. exper. med., 2008, v. 8, № 1, p. 23–29.
 8. El-Omar E.M., Carrington M., Chow W.H. et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of cancer. Nature, 2000, v. 404, p. 398–402.
 9. Figueiredo C., Machado J.C., Pharoah P. et al. *Helicobacter pylori* and interleukin 1 genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. J. Nat. Cancer Inst., 2002, v. 94, № 22, p. 1680–1687.
 10. Jung H.C., Kim J.M., Song I.S. and Kim C.Y. *Helicobacter pylori* induces an array of pro-inflammatory cytokines in human gastric epithelial cells: quantification of mRNA for interleukins-8, -1 α /beta, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, monocyte chemoattractant protein-1 and tumour necrosis factor- α . J. Gastroenterol. Hepatol., 1997, v. 12, p. 473–480.
 11. Kamangar F., Cheng C., Abnet C.C., Rabkin C.S. Interleukin-1B polymorphisms and gastric cancer risk – a meta-analysis. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 2006, v. 15, p. 1920–1928.
 12. Rad R., Dossumbekova A., Neu B. et al. Cytokine gene polymorphisms influence mucosal cytokine expression, gastric inflammation, and host specific colonisation during *Helicobacter pylori* infection. Gut, 2004, v. 53, p. 1082–1089.
 13. Shirin H., Weinstein B. and Moss S.F. Effects of *H. pylori* infection of gastric epithelial cells on cell cycle control. Front. Biosci., 2001, v. 6, p. 104–118.
 14. Wagner S., Beil W., Westermann J. et al. Regulation of gastric epithelial cell growth by *Helicobacter pylori*: Evidence for a major role of apoptosis. Gastroenterology, 1997, v. 113, p. 1836–1847.
- Поступила в редакцию 05.09.10
Получена после доработки 11.11.10
- REACTIVE CHANGES OF HUMAN GASTRIC MUCOSA INFECTED WITH *HELICOBACTER PYLORI* IN THE ASPECT OF GENETIC CHARACTERISTIC OF HOST INFLAMMATORY RESPONSE**
- Ye.G. Pomorgailo, A.V. Kononov and Ye.A. Potrokhova*
- The aim of this study was to determine the morphological changes of human gastric mucosa infected with *Helicobacter pylori* (HP) depending on polymorphism of the genes coding both interleukin-1 β and interleukin-1 receptor antagonist. 106 juveniles with HP-induced chronic gastritis were studied along with 44 juveniles with gastritis, not associated with HP. In patients with HP-associated gastritis, the significant increase in epithelial proliferation and apoptosis indexes was observed. Epithelium proliferation zone was expanded in the direction of surface foveolar epithelium and into the depth of glands; pronounced lympho-plasma cell infiltration of mucosal lamina propria was observed. Cytokine gene polymorphisms were evaluated by PCR. The results suggest an association between more pronounced inflammation of gastric mucosa with the T allele of interleukin-1 β C -511 C>T gene polymorphous locus ($\chi^2 = 14.006$; $p = 0.001$). No association was found of the interleukin-1 β C +3953 T gene and the variable number of tandem repeats in the 2nd introne of interleukin 1 receptor antagonist gene with morphological changes in the gastric mucosa.
- Key words:** *stomach, mucosa, Helicobacter pylori, cytokines, genetic polymorphism*
- Department of Pathological Anatomy with a Course of Clinical Pathology, Omsk State Medical Academy