

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Хрипач Л.В., Князева Т.Д., Железняк Е.В., Герман С.В., Зыкова И.Е., Загайнова А.В., Юдин С.М.

СОДЕРЖАНИЕ АНТИТЕЛ К АНТИГЕНАМ *HELICOBACTER PYLORI* И МАРКЁРОВ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ В СЫВОРОТКАХ КРОВИ ЖИТЕЛЕЙ МОСКВЫ

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 119991, Москва

Введение. *Helicobacter pylori* (Hp) является одним из факторов развития гастрита, язвенной болезни и рака желудка и в то же время фактором, препятствующим возникновению астмы, диабета 2-го типа и ожирения. Целью данного исследования является изучение возможной связи между содержанием антител к Hp и маркёров воспалительной реакции – ИЛ-6, ИЛ-8 и малонового диальдегида (МДА) – в сыворотках крови взрослых жителей Москвы.

Материал и методы. В пробах сыворотки крови обследуемых лиц (252 человека обоего пола трудоспособного возраста) измеряли содержание антител к лизатному антигену Hp, рекомбинантному антигену CagA, и интерлейкинов ИЛ-6, ИЛ-8 с использованием коммерческих тест-наборов ИФА. Содержание МДА оценивали по реакции с тиобарбитуровой кислотой.

Результаты. Стандартным корреляционным анализом не найдено достоверных связей между содержанием в сыворотках антител к изучавшимся антигенам Hp и содержанием в них ИЛ-6, ИЛ-8 и МДА. На двумерных графиках рассеяния значений анти-CagA/ИЛ-8 (но не ИЛ-6 и МДА) в серопозитивной области видны две параллельные ветви экспериментальных точек, соответствующие по расположению двум максимумам на бимодальном распределении содержания антител к CagA. Полученные результаты свидетельствуют о характерной для CagA опережающей индукции ИЛ-8 и свидетельствуют о наличии в популяции человека представителей двух генотипов с примерно двукратным различием по способности синтезировать антитела к CagA, но с одинаковой реактивностью оси «CagA – ИЛ-8». Сходство амплитуд CagA-зависимого и CagA-независимого (из других органов) выброса ИЛ-8 в кровь, при отсутствии признаков окислительного стресса, в равной степени позволяет интерпретировать наблюдаемые эффекты как ранние патологические или как реальные симбиотические процессы.

Заключение. Вклад популяционных исследований в изучение характера взаимодействия между Hp и организмом человека увеличится, если использовать количественное определение циркулирующих антител и не ограничиваться применением стандартных статистических тестов.

Ключевые слова: жители Москвы; *Helicobacter pylori*; CagA; циркулирующие антитела; ИЛ-6; ИЛ-8; малоновый диальдегид.

Для цитирования: Хрипач Л.В., Князева Т.Д., Железняк Е.В., Загайнова А.В., Герман С.В., Зыкова И.Е., Юдин С.М. Содержание антител к антигенам *Helicobacter pylori* и маркёров воспалительной реакции в сыворотках крови жителей Москвы. *Гигиена и санитария*. 2019; 98(12): 1437-1443. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2019-98-12-1437-1443>

Для корреспонденции: Хрипач Людмила Васильевна, доктор биол. наук, зав. лаб. биохимических и молекулярно-генетических методов исследования ФГБУ «ЦСП» МЗ РФ, 119991, Москва. E-mail: lkhrpach@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Хрипач Л.В., Князева Т.Д.; формирование выборки и организация обследования – Герман С.В., Зыкова И.Е., Загайнова А.В.; иммуноферментный и спектрофотометрический анализ – Князева Т.Д., Хрипач Л.В., Железняк Е.В.; статистическая обработка, интерпретация и написание текста – Хрипач Л.В.; руководитель научного направления по изучению микробиома – Юдин С.М.; утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Поступила 01.03.2019

Принята к печати 17.09.19

Опубликована: декабрь 2019

Khrpach L.V., Knyazeva T.D., Zheleznyak E.V., German S.V., Zyкова I.E., Zagainova A.V., Yudin S.M.

LEVELS OF H. PYLORI ANTIBODIES AND INFLAMMATORY MARKERS IN BLOOD SERUM SAMPLES OF MOSCOW RESIDENTS

Centre for Strategic Planning, Russian Ministry of Health, Moscow, 119992, Russian Federation

Introduction. *Helicobacter pylori* (Hp) is considered usually as one of the factors in the development of gastritis, peptic ulcer, and gastric cancer, and at the same time as protection from asthma, diabetes type II, and obesity. This study was carried out with a goal to evaluate possible linkage between the levels of circulating anti-Hp antibodies and inflammatory markers - IL-6, IL-8 and malonic dialdehyde (MDA) - in cross-sectional study of Moscow adults.

Material and Methods. Serum samples of Moscow working-aged residents (both gender, N=252) were used for evaluation of antibodies to lysate Hp antigen/recombinant CagA and cytokines IL-6, IL-8 with corresponding ELISA kits. MDA was determined by reaction with thiobarbituric acid.

Results. Standard correlation analysis didn't reveal any significant association between the levels of circulating antibodies against the applied commercial antigens and the levels of IL-6, IL-8 and MDA. Nevertheless, two parallel branches of the experimental points in seropositive area of anti-CagA/IL-8 scatterplot (but not for IL-6 and MDA variables) were clearly seen and correspond to two maximums at bimodal anti-CagA distribution. The data obtained are consistent with typical for CagA outstrip in IL-8 induction and testify the existence of two human genotypes having ~2-fold difference in antibody response but the same reactivity of CagA - IL-8 axis. Since CagA-positive IL-8 levels are of one order with CagA-negative ones (from another organs) and signs of concomitant oxidative stress were not revealed, the data obtained can be interpreted equally as early pathologic or actual symbiotic events.

Conclusion. *Quantitative assessment of circulating anti-*Hp* antibodies, together with more detail mathematical analysis, will increase contributions of population studies to investigation of equilibrium between *Hp* and human organisms.*

Key words: *Moscow residents; *Helicobacter pylori*; CagA; circulatory antibodies; IL-6; IL-8; malonic dialdehyde.*

For citation: Khripach L.V., Knyazeva T.D., Zheleznyak E.V., German S.V., Zykova I.E., Zagainova A.V., Yudin S.M. Levels of h. pylori antibodies and inflammatory markers in blood serum samples of Moscow residents. *Gigiena i Sanitaria (Hygiene and Sanitation, Russian journal)* 2019; 98(12): 1437-1443. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2019-98-12-1437-1443>

For correspondence: Ludmila V. Khripach, MD, Ph.D., Dsci., head of the laboratory of biochemical and molecular genetics methods, Centre for Strategic Planning, Russian Ministry of Health, Moscow, 119992, Russian Federation. E-mail: lkhrpach@mail.ru

Information about authors: Khripach L.V., <https://orcid.org/0000-0003-0170-3085>
Knyazeva T.D., <https://orcid.org/0000-0001-5279-5018>; Zheleznyak E.V., <https://orcid.org/0000-0001-9339-9310>
German S.V., <https://orcid.org/0000-0002-1628-199X>; Zykova I.E., <https://orcid.org/0000-0002-3902-7521>
Zagainova A.V., <https://orcid.org/0000-0003-4772-9686>; Yudin S.M., <https://orcid.org/0000-0002-7942-8004>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Contributions: Research concept and design – Khripach L.V., Knyazeva T.D.; sampling and survey organization – German S.V., Zykova I.E., Zagainova A.V.; ELISA and photometry analysis – Knyazeva T.D., Khripach L.V., Zheleznyak E.V.; statistical analysis, interpretation, and writing of the manuscript – Khripach L.V.; Supervision of microbiome studies – Yudin S.M.; approval of the final version, responsibility for the integrity of all parts of the article – all co-authors.

Received: March 1, 2019

Accepted: September 17, 2019

Published: December 2019

Введение

Спиралевидная бактерия, обитающая в надэпителиальной желудочной слизи человека и животных и известная теперь под названием *Helicobacter pylori* (*Hp*), была описана за столет до начала исследований нобелевских лауреатов Маршалла и Уоррена, а идея о возможной роли *Hp* в патогенезе гастрита высказана впервые ещё в 1899 г. польским учёным Яворским. В настоящее время в этой области исследований опубликовано более 40 тыс. научных работ, превративших *Hp* в модельный микроорганизм для изучения сложной взаимосвязи между микробиомом и организмом человека. Изучена генетическая вариабельность изолятов *Hp*; выделены основные белки, которые могут играть роль в проявлении патогенных свойств бактерии (*CagA*, *VacA*, *BabA*, *IceA*, флагеллины, уреазы), и в целом доказаны молекулярные механизмы их действия.

В частности, показано, что белок *CagA* может внедряться в цитоплазму эпителиоцитов желудка специальной секреторной системой IV типа – аналогом системы конъюгации бактерий. Транслоцированный *CagA*, по-видимому, имеет структурное сходство с некоторыми сигнальными молекулами организма, поскольку быстро фосфорилируется Src-протеинкиназами и принимает участие в регуляции ряда сигнальных путей, ответственных за дифференцировку эпителиоцитов и секрецию ими провоспалительных цитокинов [1–3].

CagA экспрессируется примерно половиной штаммов *Hp*, циркулирующих на европейской территории, и 70–80% штаммов на территории Юго-Восточной Азии. Напротив, вакуолизирующий цитотоксин *VacA* найден практически во всех изолятах *Hp*; этот белок способен формировать анион-селективные мембранные каналы при взаимодействии с липидными мембранами естественного или искусственного происхождения [4], является индуктором апоптоза и, по некоторым данным, модулирует проявления регуляторных свойств белка *CagA* [5].

Факторами вирулентности *Hp* считаются также фермент уреазы (катализирует превращение мочевины в аммиак, защищая бактерии от избытка соляной кислоты), жгутиковые флагеллины *FlaA* и *FlaB*, обеспечивающие их подвижность, и белки, имеющие отношение к процессу адгезии *Hp* к поверхности эпителиоцитов желудка – адгезин *BabA* (образует комплекс с системой антигенов Lewis на наружной мембране эпителиоцитов) и недавно обнаруженный белок *IceA* (экспрессируется только в адгезированных бактериях, увеличивая локальную концентрацию полиморфноядерных лейкоцитов) [6, 7].

При распространённости носительства *Hp* в разных странах от 50 до 90% подавляющее большинство носителей остаются здоровыми людьми. Неоднократно высказывалось мнение, что *Hp* является представителем нормальной мукозной

микробиоты, выполняет в организме защитные функции и только при определённых обстоятельствах может быть одним из факторов развития гастрита и рака желудка [8–12]. В частности, у носителей *Hp* значительно выше риск возникновения язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, аденокарциномы и мальтомы желудка, но в то же время ниже риск возникновения ГЭРБ, синдрома Баррета и аденокарциномы пищевода [10], а также астмы, аллергического ринита, диабета 2-го типа и ожирения [11, 12]. Единой теории, адекватно объясняющей всю совокупность этих данных, пока не существует. Маастрихтские соглашения рассматривают *Hp* как характерный для менее развитых стран инфекционный агент с орально-фекальным переносом и длительным бессимптомным носительством [13], концепция Блейзера – как защитный симбиотический компонент микробиома, выбитый у части населения развитых стран неумеренным употреблением антибиотиков [12].

Тем не менее по-прежнему остаётся непонятным, в каких ситуациях паритетные отношения между *Hp* и хозяйским организмом сменяются на противостояние. С этой точки зрения большой интерес представляют поперечные популяционные исследования, перекрывающие весь диапазон реакций представителей данной популяции на присутствие в организме *Hp*, хотя они и имеют существенный недостаток, связанный с отсутствием биопсийного материала для идентификации изолятов методами ПЦР. В популяционных исследованиях носительства *Hp* оценивается непрямыми методами – как правило, по наличию сывороточных антител к антигенам *Hp* (частично очищенным экстрактам или отдельным рекомбинантным белкам) [14–18]. В большинстве случаев результаты бывают представлены в традиционном качественном варианте – как доля лиц с наличием и отсутствием сывороточных антител к используемому антигенному препарату *Hp*, ориентируясь на заявленный производителем тест-набора уровень среза (cut-off).

Ранее нами были получены количественные данные по содержанию антител к двум коммерческим антигенам *Hp* в сыворотках выборки 319 трудоспособных жителей Москвы, охарактеризованы их распределения и высказаны определённые предположения относительно причин, по которым содержание сывороточных антител к комплексному лизатному антигену *Hp* имело логнормальное распределение, а к рекомбинантному антигену *CagA* – относительно симметричное бимодальное [19].

Целью данного исследования является изучение возможной связи между содержанием в сыворотках крови жителей Москвы антител к вышеперечисленным коммерческим антигенам *Hp* и содержанием в них маркеров воспалительной реакции – провоспалительных цитокинов (интерлейкина-8, интерлейкина-6) и конечного продукта окислительного стресса

Таблица 1

Данные качественного анализа по наличию антител к лизатному антигену Нр и рекомбинантному антигену СagA в сыворотках обследованных жителей Москвы

Антитела	Результат ИФА						Всего	
	отрицательный		сомнительный		положительный			
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
К лизатному антигену Нр	26	10,3	8	3,2	218	86,5	252	100
К рекомбинантному антигену СagA	118	46,8	5	2,0	129	51,2	252	100

малонового диальдегида (МДА). Известно, что интерлейкин-8 (ИЛ-8) является маркерным цитокином EGF-зависимого пути взаимодействия СagA с эпителиоцитами желудка и раньше других цитокинов реагирует на добавление живых бактерий Нр, особенно СagA-позитивных штаммов, к краткосрочным и постоянным культурам эпителиоцитов [2, 20–22]. Образование интерлейкина-6 (ИЛ-6) и других цитокинов (ИЛ-1 β , α -ФНО, γ -ИФН) при этом тоже увеличивается, но позже и в меньшей степени, чем образование ИЛ-8. Имеется также определённое количество публикаций, демонстрирующих, что носительство Нр увеличивает содержание МДА в сыворотке крови и биоптатах слизистой оболочки желудка, в частности у пациентов с дуоденальными язвами и хронических алкоголиков [23, 24].

Материал и методы

Для выполнения данной цели из первоначальной выборки трудоспособных жителей Москвы, описанной в нашей предыдущей статье и включавшей 319 лиц обоёго пола [19], было случайным образом отобрано 252 человека (188 мужчин и 64 женщины в возрасте от 23 до 65 лет, медиана 42 г., Q_1 – Q_3 34–51 год). Было получено информированное согласие обследуемых лиц, проходивших ежегодный медосмотр по добровольному медицинскому страхованию на одном из московских предприятий, на использование части сыворотки крови, предназначенной для стандартного клинико-лабораторного анализа, для проведения данного популяционного исследования. Пробы венозной крови отбирали в вакутейнеры с активатором свёртывания и разделительным гелем; образцы сыворотки хранили до процедуры определения при -24 °С.

Содержание иммуноглобулинов класса G (IgG) к комплексу характерных для Нр белков («лизатному инактивированному очищенному антигену») определяли с помощью тест-наборов ИФА-Хеликобактер IgG (ЗАО «ЭКОлаб») и выражали в титрах прилагаемого контрольного образца. Методические детали построения калибровочной кривой и её аппроксимации подробно описаны в предыдущей статье [19].

Содержание суммарных антител (IgM, IgA и IgG) к рекомбинантному антигену СagA определяли с помощью тест-наборов «ХеликоБест-антитела» (ЗАО «Вектор-Бест»). Особенностью этих тест-наборов является то, что рекомбинантный СagA вступает в реакцию связывания с определяемыми сывороточными антителами дважды – как иммобилизованный на планшете антиген и как компонент конъюгата с пероксидазой. Специфичность анализа при этом резко увеличивается, но утрачивается возможность разделять реагирующие иммуноглобулины сыворотки по классам. Тест-наборы «ХеликоБест-антитела» содержат два контрольных образца сыворотки, положительный и отрицательный, без указания титров антител. Поэтому содержание антител к СagA в сыворотках обследуемых лиц мы выражали в относительных единицах ИФА (EU, elisa units) – как отношение оптической плотности (ОП) инкубационной среды для анализируемой сыворотки к ОП для положительного контрольного образца, содержание антител в котором условно принималось за 100 EU [25].

Таблица 2

Содержание антител к лизатному антигену Нр и рекомбинантному антигену СagA в сыворотках серопозитивных к данному антигену жителей Москвы

Антитела	Уровень среза	Основные характеристики распределения					
		<i>n</i>	<i>min</i>	<i>max</i>	<i>Me</i>	Q_1	Q_3
К лизатному антигену Нр (в титрах стандарта)	1:100	218	1:115	1:5882	1:647	1:340	1:1165
К антигену СagA (в усл. ед. ИФА, EU)	20,4	129	22,8	129,1	85,4	55,7	101,8

Качественный анализ разделения сывороток на имеющиеся отрицательный (–), сомнительный (+/–) и положительный (+) результаты наличия антител проводили в полном соответствии с рекомендациями производителей данных тест-наборов. Границы «зоны неопределённости» для тест-наборов «ИФА-Хеликобактер IgG» определены как диапазон титров от 1:90 до 1:110, а для тест-наборов «ХеликоБест-антитела» – как диапазон оптических плотностей от (ОПкрит – 0,05) до (ОПкрит + 0,05), где ОПкрит рассчитывается как среднее значение ОП для отрицательного контрольного образца плюс 0,35.

Содержание ИЛ-6 и ИЛ-8 в пробах сыворотки крови определяли с помощью тест-наборов «Интерлейкин-6-ИФА-БЕСТ» и «Интерлейкин-8-ИФА-БЕСТ» (ЗАО «Вектор-Бест»), содержание МДА – по образованию цветного комплекса с тиобарбитуровой кислотой [26], используя в качестве стандарта 1,1,3,3-тетраэтоксипропан (ТЕР, Sigma T9889).

Математический анализ данных проводили в пакете программ Statistica for Windows v. 7.0. Использовались методы оценки основных статистик, характера распределения переменных, достоверности различий независимых выборок в тесте Манна-Уитни и корреляционно-регрессионного анализа взаимосвязи индивидуальных значений переменных с контролем двумерных точечных графиков (scatterplots).

Результаты

В табл. 1 приведены результаты традиционного качественного анализа распространённости Нр с разделением обследованных лиц на серопозитивную и серонегативную подвыборки по отношению к каждому антигену, а в табл. 2 – основные характеристики распределений содержания сывороточных антител у серопозитивных к данному антигену лиц. Ориентируясь на установленные производителями тест-наборов уровни среза, положительная реакция на наличие сывороточных IgG антител к лизатному антигену Нр была выявлена у 218 человек из 252 обследованных (86,5%) с титрами антител от 1:115 до 1:5882 (медиана 1:647); положительная реакция на наличие антител к рекомбинантному антигену СagA – у 129 человек (51,2%) с содержанием антител в условных единицах ИФА (EU, elisa units) от 22,8 до 129,1 (медиана 85,4 EU). Данные областей неопределённости (8 и 5 человек, табл. 1) были удалены из дальнейшего анализа.

Как и в нашем предыдущем исследовании [19], содержание сывороточных антител к лизатному антигену Нр имело логнормальное распределение, а к рекомбинантному антигену СagA – относительно симметричное бимодальное, с максимумами около 45 и 98 EU (рис. 1).

Традиция разделения сывороток на серопозитивные и серонегативные ударяет прежде всего по возможностям оценить последствия носительства антител к комплексу характерных для Нр белков – лизатному антигену, поскольку при распространённости носительства антител к Нр в нашей стране порядка 80–90% сравниваемые подвыборки Нр– и Нр+ имеют несопоставимые объёмы. В данном исследовании при сравнении 26 серонегативных и 218 серопозитивных к лизатному

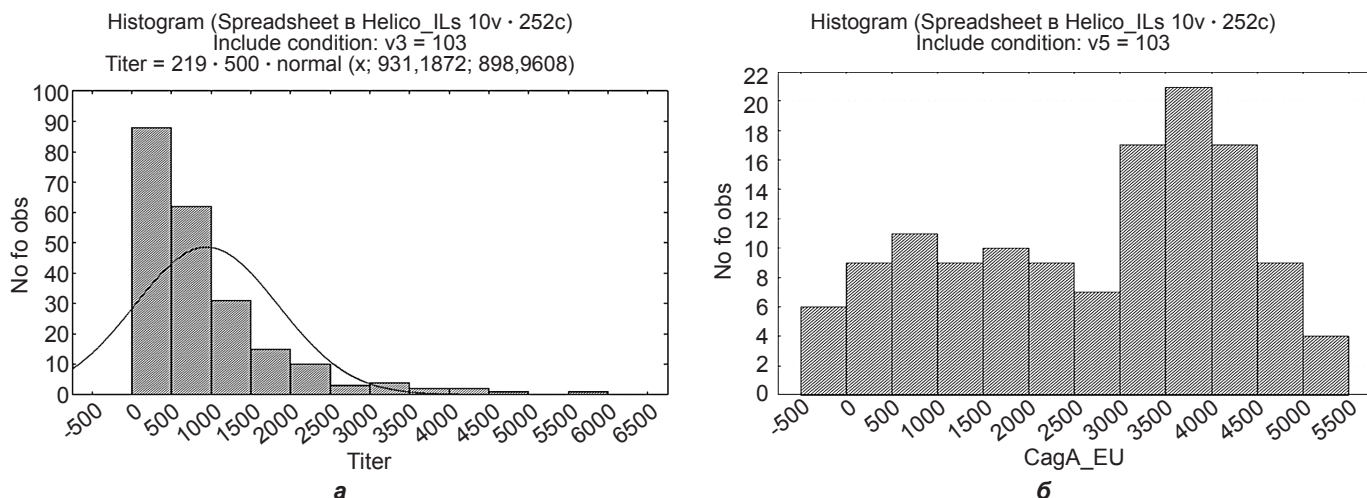


Рис. 1. Распределения содержания антител к лизатному антигену Hr (а) и рекомбинантному антигену CagA (б) в сыворотках крови серопозитивных к данному антигену лиц ($n = 218$ и 129 соответственно, данные для лиц с отрицательной и сомнительной реакцией в обоих случаях удалены).

антигену лиц с помощью двустороннего теста Манна–Уитни мы получили достоверные различия по содержанию в сыворотках обоих провоспалительных цитокинов, ИЛ-6 и ИЛ-8, с примерно 30%-ными превышениями у носителей антител к Hr (табл. 3).

Однако на точечных графиках зависимости содержания ИЛ-6 и ИЛ-8 от титров антител к лизатному антигену Hr (один из них показан на рис. 2, второй аналогичен) никакой связи между изучаемыми переменными не обнаруживалось. В данном случае можно достаточно уверенно считать, что достоверные различия между подвыборками Hr– и Hr+ по содержанию в сыворотках цитокинов, полученные в тесте Манна–Уитни, являются артефактом, в возникновении которого сыграло роль не только восьмикратное различие подвыборок по объёму (26 и 218 человек), но и скошенные влево распределения зависимых переменных – ИЛ-6 (показано на врезке, см. рис. 2) и ИЛ-8. Известно, что вероятность попадания экспериментальных значений в тот или иной участок распределения случайной

величины определяется его плотностью. При сдвиге медианы влево верхний квартиль распределения заполняется медленней остальных, и между подвыборками существенно разного объёма появляется дисбаланс – в большей он уже в какой-то степени заполнен, в меньшей только начинает заполняться. Для содержания в сыворотках МДА, имевшего близкое к нормальному распределение, достоверных различий между подвыборками Hr– и Hr+ выявлено не было.

Показанное в табл. 3 отсутствие достоверных различий по содержанию ИЛ-6 и ИЛ-8 между носителями антител к антигену CagA и соответствующими серонегативными лицами не вызывает сомнений, поскольку эти подвыборки близки по объёму (129 и 118 человек). Используя количественные данные по содержанию антител к CagA, мы также не получили достоверных коэффициентов корреляции между этой переменной и содержанием в сыворотках ИЛ-6, ИЛ-8 и МДА – ни в полной выборке, ни в подвыборке серопозитивных к CagA лиц (табл. 4).

Таблица 3

Содержание ИЛ-6, ИЛ-8 и МДА (Me [Q1–Q3]) в сыворотках крови обследованных жителей Москвы при их традиционном разделении на серопозитивные и серонегативные к данному антигену

Наличие антител	Количество человек, n	ИЛ-6, пг/мл	ИЛ-8, пг/мл	МДА, мкМ
<i>Антитела к комплексному лизатному антигену</i>				
Hr–	26	2,61 [1,97–3,32]	30,2 [22,1–40,6]	20,3 [18,3–25,2]
Hr+	218	3,31 [2,29–4,73]	38,8 [28,6–59,0]	21,9 [18,0–26,8]
Достоверность различий, $p^{\#}$		0,041*	0,022*	0,41
<i>Антитела к рекомбинантному антигену CagA</i>				
CagA–	118	3,28 [2,28–4,65]	39,3 [27,6–59,4]	22,4 [18,5–27,6]
CagA+	129	3,23 [2,16–4,56]	37,0 [28,5–59,0]	21,3 [17,6–26,2]
Достоверность различий, $p^{\#}$		0,63	0,95	0,33

Примечание. $\#$ – двусторонний тест Манна–Уитни; * – $p < 0,05$.

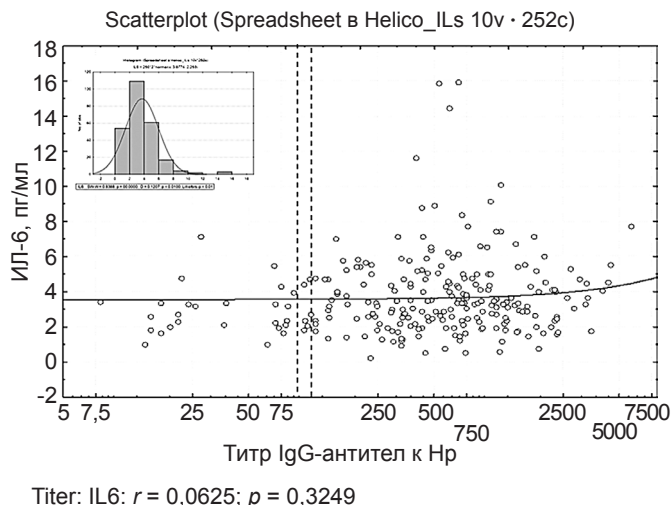


Рис. 2. Зависимость содержания ИЛ-6 от содержания антител к лизатному антигену Hr в сыворотках крови обследованных жителей Москвы.

Ось абсцисс логарифмирована, пунктиром ограничена область неопределённости с титрами антител от 1:90 до 1:110. На врезке показана гистограмма распределения содержания в сыворотках ИЛ-6.

Однако внутри серопозитивной подвыборки на графике зависимости содержания ИЛ-8 (но не ИЛ-6 или МДА) от содержания антител к CagA (рис. 3) видны две параллельные ветви экспериментальных точек, соответствующие по расположению двум максимумам на бимодальном распределении содержания антител к CagA (см. рис. 1, б). Следовательно, по крайней мере у части носителей CagA-позитивных штаммов увеличение антителообразования сопровождается пропорциональным увеличением выброса в кровь ИЛ-8 при неизменённом выбросе ИЛ-6.

Обсуждение

Данные, полученные *in vitro* на культурах эпителиоцитов желудка [2, 20, 27] и *in vivo* с использованием эндоскопического материала пациентов [21, 22, 28–30], практически без исключений свидетельствуют о наличии прочной связи между присутствием Hp, особенно CagA-позитивных штаммов, и скоростью генерации эпителиоцитами провоспалительных цитокинов, прежде всего ИЛ-8. В опытах по добавлению бактерий Hp к культурам эпителиоцитов желудка индукция ИЛ-8 настолько опережает индукцию других провоспалительных цитокинов, что первоначальная традиция оценивать спектр из 5–6 цитокинов постепенно вытеснилась оценкой экспрессии одного ИЛ-8.

Пул циркулирующих цитокинов пополняется из всех органов, поэтому неудивительно, что связь между носительством Hp и содержанием провоспалительных цитокинов в сыворотке крови гораздо более слабая и выявляется не всегда, даже если носительство Hp оценивается не опосредованно по наличию в крови антител, а прямыми методами анализа биоптатов желудка [31–35]. Например, в смешанной выборке пациентов эндоскопического отделения с гастритом или язвенной болезнью желудка найдены достоверные различия сывороточных концентраций ИЛ-8 между носителями CagA-позитивных и CagA-негативных изолятов Hp: $235,2 \pm 21,7$ ($n = 84$) и $156,9 \pm 11,8$ ($n = 26$) пг/мл соответственно; уровень экспрессии гена CagA в биоптатах антрального отдела желудка определялся методом гибридизации РНК *in situ* [31]. В сходном исследовании не найдено связи между результатами амплификации фрагмента гена CagA в биоптатах и сывороточными концентрациями ИЛ-8 в группах больных хроническим гастритом (30 человек), язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки (14 человек), гастропатией (22 человека) и здоровых лиц (14 человек) – возможно, из-за небольшого размера выборок [32]. Выявлены достоверные различия между Hp+ и Hp– пациентами с ишемической болезнью сердца по содержанию ИЛ-6 и ФНО- α в биоптатах слизистой оболочки желудка, но не в пробах сыворотки крови (носительство Hp устанавливалось по сочетанию результатов быстрого уреазного теста и культивирования биоптатов на селективной среде) [34]. В одной и той же работе на выборке из 80 пациентов с гастритом не найдено достоверных различий по содержанию ИЛ-8 в сыворотках Hp+ и Hp– пациентов (носительство Hp устанавливалось по результатам быстрого уреазного теста биоптатов), но при этом найдены достоверные связи между содержанием в сыворотках ИЛ-8 и выраженными в баллах показателями состояния слизистой оболочки желудка – степенью хронических воспалительных изменений и инфильтрации нейтрофилами (соотношение шансов 2,496 и 2,926; $p = 0,045$ и $0,037$ соответственно) [35].

Дополнительный смешивающий фактор появляется в тех случаях, когда о наличии в организме Hp и CagA судят по содержанию в сыворотке соответствующих антител. Образование антител не является простой функцией наличия Hp в организме и зависит как от особенностей иммунной системы человека (индивидуальной реактивности, времени жизни клеток иммунной памяти, возможного развития толерантности и т. п.), так и от характеристик используемого антигенного препарата (особенно если это лизатные, частично очищенные смеси антигенов, но даже электрофоретически чистые рекомбинантные белки – в частности, CagA, – могут в большей или меньшей степени соответствовать по первичной аминокислотной последовательности и конформации циркулирующим

Таблица 4

Коэффициенты корреляции Спирмена между содержанием антител к изучавшимся антигенам Hp и тремя зависимыми переменными (ИЛ-6, ИЛ-8 и МДА) в сыворотках крови обследованных жителей Москвы

Антитела	n	ИЛ-6, пг/мл		ИЛ-8, пг/мл		МДА, мкМ	
		R	p	R	p	R	p
<i>В полной выборке</i>							
Анти-Hp, титры	252	0,108	0,087	0,108	0,090	-0,010	0,873
Анти-CagA, EU	252	-0,035	0,578	0,013	0,842	-0,043	0,506
<i>В подвыборках серопозитивных лиц</i>							
Анти-Hp, титры	218	0,035	0,602	0,036	0,599	-0,042	0,542
Анти-CagA, EU	129	-0,046	0,603	-0,055	0,536	0,097	0,286

в данном регионе изолятам [3, 18]). В настоящее время этот подход используют преимущественно кардиологи для подтверждения отягчающего влияния Hp на состояние организма своих пациентов, с чем связан и выбор ими ИЛ-6 (а не ИЛ-8) как маркёрного цитокина прогрессии сердечно-сосудистых заболеваний [36–38].

Используя этот невыигрышный, но единственно возможный в популяционных исследованиях сценарий для поиска взаимосвязи между содержанием антител к антигенам Hp и содержанием провоспалительных цитокинов в сыворотках выборки жителей Москвы, мы ввели в него следующие поддерживающие элементы: большая выборка, количественный анализ содержания антител, «вилка» из двух цитокинов с разной маркёрной реакцией на Hp, дополнительный к формальным статистическим методам анализ рассеяния индивидуальных значений сравниваемых переменных на двумерных графиках (scatterplots). В результате были найдены графические признаки наличия связи (состоящей из двух ветвей и не выявляемой обычным корреляционным анализом) между содержанием в сыворотках антител к рекомбинантному антигену CagA и содержанием в них провоспалительного цитокина ИЛ-8 (см. рис. 3).

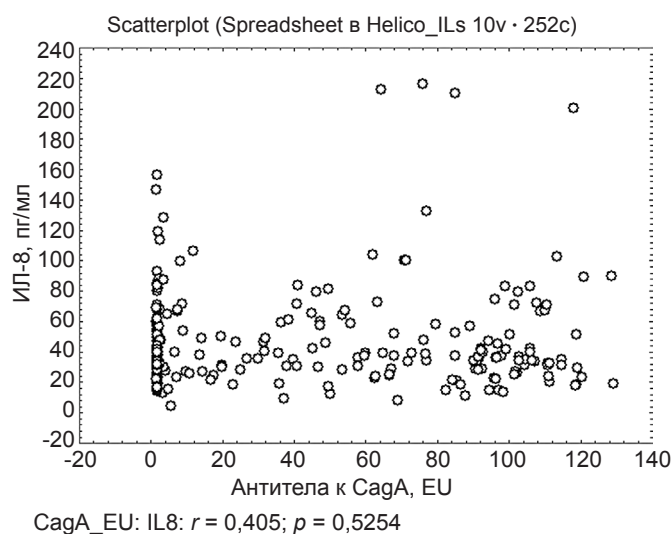


Рис. 3. Зависимость содержания ИЛ-8 (пг/мл) от содержания антител к CagA (EU, ELISA units) в сыворотках крови обследованных жителей Москвы. Нижняя граница серопозитивности 20,4 EU.

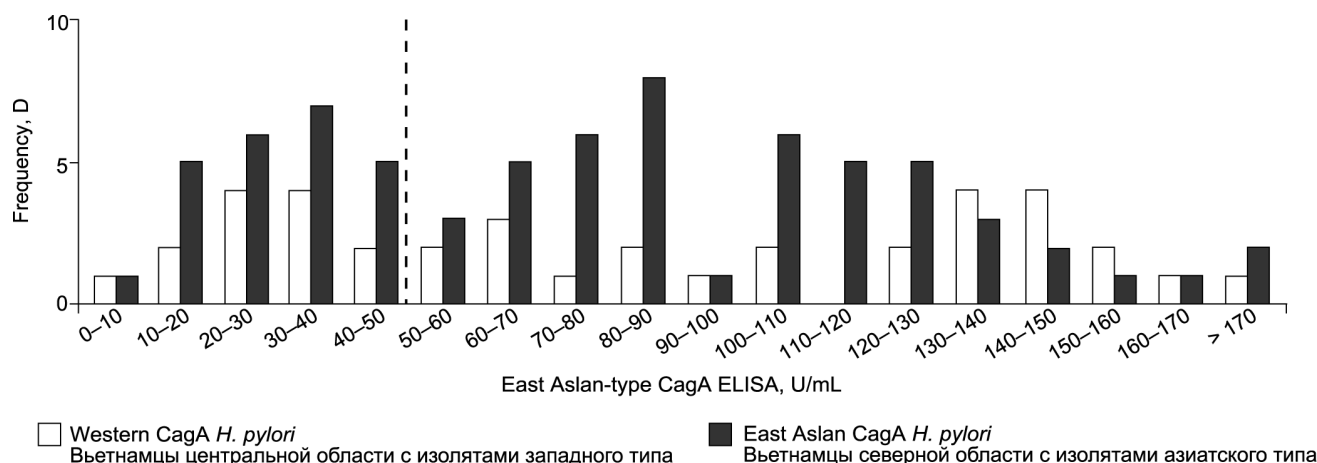


Рис. 4. Распределение содержания антител к рекомбинантному антигену восточноазиатского типа в сыворотках крови жителей Вьетнама (Figure 3 D из статьи [Matsuo]).

Пунктиром показано значение уровня среза (45,0 U/ml).

О том, что этот визуальный эффект не случаен, свидетельствуют следующие обстоятельства:

1) из двух взятых нами в виде скрининговой «вилки» цитокинов именно ИЛ-8, по литературным данным, реагирует на наличие CagA-зависимых штаммов *H. pylori* раньше и выше остальных, включая ИЛ-6;

2) параллельные ветви экспериментальных точек на рис. 3 соответствуют по расположению двум максимумам на бимодальном распределении содержания антител к CagA (см. рис. 1, б);

3) это бимодальное распределение, в свою очередь, сходно с бимодальным распределением содержания антител к восточноазиатскому варианту CagA у жителей Вьетнама [18] (рис. 4) и поэтому вряд ли может оказаться случайным. Дополнительный максимум ниже уровня среза на рис. 4 принадлежит серонегативной подвыборке, не показанной на рис. 1, б.

Выявленная нами связь между содержанием антител к CagA и содержанием ИЛ-8 в сыворотках крови обследованных жителей Москвы свидетельствует о существовании двух разных генотипов людей с примерно двукратным различием по базальному уровню антител к CagA, но сходной реактивностью оси «CagA – ИЛ-8», поскольку образуемые экспериментальными точками ветви на рис. 3 практически параллельны.

Табл. 3 и рис. 3 показывают также, что CagA-зависимый выброс ИЛ-8 в кровь у обследованных жителей Москвы находится в том же диапазоне величин, что и CagA-независимый – соответствующий области серонегативности и объясняющий выходом ИЛ-8 в циркуляцию из других органов или из желудка, но за счёт других механизмов. Отсутствует также связь между содержанием в сыворотках антител к CagA и содержанием МДА – продукта перекисного окисления липидов. Следовательно, реакция на наличие в организме CagA-положительных штаммов *H. pylori* в московской популяции видна, но она не носит драматического характера, не сопровождается признаками окислительного стресса и в равной степени может быть интерпретирована как свидетельство симбиотических или ранних патологических процессов.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что перечисленные популяционные исследования могут внести большой вклад в изучение характера взаимодействия между *H. pylori* и организмами людей-носителей, если использовать количественный анализ содержания сывороточных антител и не ограничиваться применением стандартных статистических тестов.

Литература

(пп. 1–7, 10–15, 18, 20–31, 33–38 см. References)

- Чернин В.В., Бондаренко В.М., Червинец В.М., Базлов С.Н. *Helicobacter pylori* как составная часть микробиоценоза мукозной микрофлоры эзофагогастроуденальной зоны в норме и патологии. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2011; 8: 66–72.
- Циммерман Я.С. Действительно ли открытие *Helicobacter pylori* стало революцией в гастроэнтерологии. *Клиническая медицина*. 2013; 8: 13–21.
- Климович А.В. Создание иммунохимических реагентов для выявления CagA-антигена *Helicobacter pylori* и антител против него. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб; 2010. 20 с.
- Варганова Н.О., Арзуманян Н.О., Поддубиков А.В., Ванеева Н.П., Сердюк О.А. Совершенствование иммунодиагностики хеликобактериоза. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2007; 4: 34–7.
- Хрипач Л.В., Князева Т.Д., Юдин С.М., Герман С.В., Зыкова И.Е. Сравнительный анализ содержания антител к *H. pylori* и рекомбинантному антигену CagA в сыворотках выборки трудоспособного населения Москвы. *Гигиена и санитария*. 2018; 9: 785–90.
- Камнева Е.В., Умерова А.Р., Камнева Н.В. CagA ген *Helicobacter pylori*: корреляция с ИЛ-8, анти-CagA IgG и pH желудка при патологии желудка и двенадцатиперстной кишки. *Астраханский медицинский журнал*. 2011; 6 (1): 72–5.

References

- Backert S., Tegtmeyer N. Type IV secretion and signal transduction of *Helicobacter pylori* CagA through interactions with host cell receptors. *Toxins (Basel)*. 2017; 9 (4): E115. DOI: 10.3390/toxins9040115.
- Keates S., Sougioultzis S., Keates A.C., Zhao D. et al. Cag+ *Helicobacter pylori* induce transactivation of the epidermal growth factor receptor in AGS gastric epithelial cells. *J Biol Chem*. 2001; 276 (51): 48127–34.
- Naito M., Yamazaki T., Tsutsumi R., Higashi H., Onoe K., Yamazaki S. et al. Influence of EPIYA-repeat polymorphism on the phosphorylation-dependent biological activity of *Helicobacter pylori* CagA. *Gastroenterology*. 2006; 130 (4): 1181–90.
- Szabo I., Brutsche S., Tombola F., Moschioni M., Satin B., Telford J.L. et al. Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity. *The EMBO J*. 1999; 18 (20): 5517–27.
- Jones K.R., Whitmire J.M., Merrell D.S. A tale of two toxins: *Helicobacter pylori* CagA and VacA modulate host pathways that impact disease. *Front Microbiol*. 2010; 23 (1): 115. DOI: 10.3389/fmicb.2010.00115.
- Kao C.Y., Sheu B.S., Wu J.J. *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. *Biomed J*. 2016; 39: 14–23.
- Cellini L., Donelli G. Virulence factors of *Helicobacter pylori*. *Microb Ecol Health Dis*. 2000; 12 (2): 259–62.
- Chernin V.V., Bondarenko V.M., Chervinets V.M., Bazlov S.N. *Helicobacter pylori* as a part of microbiocenosis of mucosal microflora esopha-

- go-gastrointestinal zone in the norm and pathology. *Eksperimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya*. 2011; 8: 66–72. (in Russian)
9. Tsimmerman Ya.S. Has the discovery of *Helicobacter pylori* actually made a revolution in gastroenterology? *Klinicheskaya meditsina*. 2013; 8: 13–21. (in Russian)
 10. Blaser M.J. Hypothesis: The changing relationships of *Helicobacter pylori* and humans: implications for health and disease. *J Infect Diseases*. 1999; 179: 1523–30.
 11. Blaser M.J., Chen Y., Reibman J. Does *Helicobacter pylori* protect against asthma and allergy? *Gut*. 2008; 57 (5): 561–7.
 12. Blaser M.J. Who are we? Indigenous microbes and the ecology of human diseases. *EMBO reports*. 2006; 7 (10): 956–60.
 13. Malfertheiner P., Megraud F., O'Morain C.A., Gisbert J.P., Kuipers E.J., Axon A.T. et al. Management of *Helicobacter pylori* infection – the Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut*. 2017; 66: 6–30.
 14. Li S., Lu A.P., Zhang L., Li Y.D. Anti-*Helicobacter pylori* immunoglobulin G (IgG) and IgA antibody responses and the value of clinical presentations in diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in patients with precancerous lesions. *World J Gastroenterol*. 2003; 9 (4): 755–8.
 15. Yan J., Mao Y.F., Shao Z.X. Frequencies of the expression of main protein antigens from *Helicobacter pylori* isolates and production of specific serum antibodies in infected patients. *World J Gastroenterol*. 2005; 11 (3): 421–5.
 16. Klimovich A.V. Development of immunoreagents for diagnostics of CagA-positive *Helicobacter pylori* infections. Autoabstract of Diss. St. Petersburg; 2010. 20 p. (in Russian)
 17. Vartanova N., Arzumanyan V., Poddubikov A., Vaneeva N., Serdiuk O. Method of isolation of highly specific antigenic preparation from *Helicobacter pylori*. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2007; 4: 34–7. (in Russian)
 18. Matsuo Y., Kido Y., Akada J., Shiota S., Binh T.T., Trang T. et al. Novel CagA ELISA exhibits enhanced sensitivity of *Helicobacter pylori* CagA antibody. *World J Gastroenterol*. 2017; 23 (1): 48–59.
 19. Khripach L.V., Knjazeva T.D., Yudin S.M., German S.V., Zykova I.E. Comparative analysis of serum antibody responses to *H. pylori* and to recombinant CagA in the cohort of working-age moscow adults. *Gigiena i sanitariya [Hygiene and Sanitation, Russian journal]*. 2018; 97 (9): 785–90. (in Russian)
 20. Fazeli Z., Alebouyeh M., Rezaei M., Azimirad M. et al. *Helicobacter pylori* CagA induced interleukin-8 secretion in gastric epithelial cells. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2016; 9 (Suppl 1): S42–S46.
 21. Katagiri M., Asaka M., Kobayashi M., Kudo M. et al. Increased cytokine production by gastric mucosa in patients with *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Gastroenterol*. 1997; 25 (Suppl 1): S211–S214.
 22. Ando T., Kusugami K., Ohsuga M., Shinoda M. et al. Interleukin-8 activity correlates with histological severity in *Helicobacter pylori*-associated antral gastritis. *Am J Gastroenterol*. 1996; 91 (6): 1150–6.
 23. Santra A., Chowdhury A., Chaudhuri S., Das Gupta J., Banerjee P.K., Mazumder D.N. Oxidative stress in gastric mucosa in *Helicobacter pylori* infection. *Indian J Gastroenterol*. 2000; 19 (1): 21–3.
 24. Qu B., Su J., Wang Z., Wang Y., Han X., Wang H. et al. Effect of *H. pylori* infection on cytokine profiles and oxidative balance in subjects with chronic alcohol ingestion. *PLoS One*. 2015; 10 (6): e0129352. DOI: 10.1371/journal.pone.0129352.
 25. Cardoso L., Lopes A.P., Sherry K., Schallig H., Solano-Gallego L. Low seroprevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from northern Portugal based on DAT and ELISA. *Vet Parasitol*. 2010; 174 (1–2): 37–42.
 26. Stocks J., Dormandy T.L. A direct thiobarbituric acid-reacting chromogen in human red blood cells. *Clin Chim Acta*. 1969; 27: 117–20.
 27. Crabtree J.E., Covacci A., Farmery S.M., Xiang Z., Tompkins D.S., Perry S. et al. *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 expression in gastric epithelial cells is associated with CagA positive phenotype. *J Clin Pathol*. 1995; 48: 41–5.
 28. Yamaoka Y., Kita M., Kodama T., Sawai N., Kashima K., Imanishi J. Induction of various cytokines and development of severe mucosal inflammation by cagA gene positive *Helicobacter pylori* strains. *Gut*. 1997; 41: 442–51.
 29. Peek R.M., Miller G.G., Tham K.T., Perez-Perez G.I., Zhao X., Atherton J.C. et al. Heightened inflammatory response and cytokine expression *in vivo* to CagA+ *Helicobacter pylori* strains. *Lab Invest*. 1995; 71: 760–70.
 30. Klausz G., Tiszai A., Tiszlavicz L., Gyulai Z., Lénárt Z., Lonovics J. et al. Local and peripheral cytokine response and CagA status of *Helicobacter pylori*-positive patients with duodenal ulcer. *Eur Cytokine Netw*. 2003; 14 (3): 143–8.
 31. Khudhur S., Karhoot J., Al-Khafaji J., Mohsin J. Increase serum IL-8 level in Iraqi patients with *Helicobacter pylori* CagA genotype infection. *Iraqi Postgrad Med J*. 2011; 10 (1): 120–4.
 32. Kamneva E.V., Umerova A.R., Kamneva N.V. CagA gene of *Helicobacter pylori*: correlation with IL-8, anti-CagA IgG and pH of the stomach in case of stomach and duodenum pathology. *Astrakhanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2011; 6 (1): 72–5. (in Russian)
 33. Bayraktaroglu T., Aras A.S., Aydemir S., Davutoğlu C., Ustundag Y., Atmaca H. et al. Serum levels of tumor necrosis factor- α , interleukin-6 and interleukin-8 are not increased in dyspeptic patients with *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Mediators Inflamm*. 2004; 13 (1): 25–8.
 34. Bonaventura G., Piccolomini R., Pompilio A., Zappacosta R., Piccolomini M., Neri M. Serum and mucosal cytokine profiles in patients with active *Helicobacter pylori* and ischemic heart disease: is there a relationship? *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2007; 20 (1): 163–72.
 35. Siregar G.A., Halim S., Sitepu R.R. Serum TNF- α , IL-8, VEGF levels in *Helicobacter pylori* infection and their association with degree of gastritis. *Acta Med Indones*. 2015; 47 (2): 120–6.
 36. El-Mashad N., El-Emshaty W.M., Arfat M.S., Koura B.A., Metwally S.S. Relation of Cag-A-positive *Helicobacter pylori* strain and some inflammatory markers in patients with ischemic heart diseases. *Egypt J Immunol*. 2009; 16 (1): 39–47.
 37. Figura N., Palazzuoli A., Vaira D., Campagna M., Moretti E., Iacoponi F. et al. Cross-sectional study: CagA-positive *Helicobacter pylori* infection, acute coronary artery disease and systemic levels of B-type natriuretic peptide. *J Clin Pathol*. 2014; 67 (3): 251–7.
 38. Rasmi Y., Raëisi S., Mohammadzad M.H. Association of inflammation and cytotoxin-associated gene a positive strains of *Helicobacter pylori* in cardiac syndrome X. *Helicobacter*. 2012; 17 (2): 116–20.