

МОХОНОВА
ЕКАТЕРИНА ВАЛЕРЬЕВНА

**АНАЛИЗ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ У ПАЦИЕНТОВ
С ХРОНИЧЕСКИМ ГАСТРИТОМ, ИНФИЦИРОВАННЫХ
*HELICOBACTER PYLORI***

3.2.7. Иммунология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Екатеринбург – 2025

Работа выполнена в лаборатории иммунохимии Федерального бюджетного учреждения науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Научный руководитель

доктор биологических наук, профессор,
Заслуженный деятель науки РФ

**Новиков
Виктор Владимирович**

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук, доцент,
профессор кафедры микробиологии, иммунологии и
общей биологии ФГБОУ ВО «Челябинский
государственный университет»

**Филиппова
Юлия Юрьевна**

Доктор медицинских наук, профессор,
профессор кафедры терапии, декан Института
дополнительного профессионального образования
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения Российской Федерации

**Сарсенбаева
Айман Силкановна**

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарёва», г. Саранск

Защита диссертации состоится «___» _____ 2025 г. в _____ часов на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук 24.1.063.01 на базе ФГБУН Института иммунологии и физиологии УрО РАН по адресу: 620078, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке УрО РАН по адресу: 620041, г. Екатеринбург, ул. Софьи Ковалевской/Академическая, 22/20 и на сайте ИИФ УрО РАН (<http://iir.uran.ru>), с авторефератом – там же и на сайте ВАК РФ (<http://vak2.ed.gov.ru>).

Автореферат разослан «___» _____ 2025 г.

Ученый секретарь Совета 24.1.063.01
на базе Института иммунологии и физиологии УрО РАН,
кандидат биологических наук

Ю.А. Журавлёва

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования. *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) является одной из широко распространенных инфекций человека и ведущим этиологическим фактором хронического гастрита, язвы желудка и двенадцатиперстной кишки, аденокарциномы и MALT-лимфомы (Mucosa Associated Lymphoid Tissue) (Шкитин В.А. и соавт., 2002; Baj J. et al., 2021). Распространение *H. pylori*-инфекции значительно различается в зависимости от географической области, возраста, этнической принадлежности и социально-экономического статуса. Эпидемиологические данные свидетельствуют о том, что приблизительно половина населения мира инфицирована данным микроорганизмом (Li Y. et al., 2023; Bordin D.S. et al., 2024). Организм хозяина реагирует на появление *H. pylori*, вырабатывая иммунный ответ, который не всегда оказывается достаточно эффективным для устранения инфекции (Талаев В.Ю. и соавт., 2021). *H. pylori* модулирует иммунный ответ и оказывает значимое влияние на гомеостаз организма хозяина. Результатом служит ограниченная воспалительная реакция, которая, с одной стороны, поддерживается на протяжении длительного времени, а с другой стороны, не обладает способностью обеспечить освобождение организма от инфекционного агента. Возникает хроническое течение хеликобактерной инфекции, часто без выраженных симптомов и проявлений, но с носительством *H. pylori* (Lundgren A. et al., 2005). В случаях активного характера течения провоспалительных реакций, когда ослабевает модулирующее действие регуляторных Т-лимфоцитов и активируются популяции провоспалительных клеток, возникают выраженные деструктивно-воспалительные изменения слизистой желудка и двенадцатиперстной кишки при сохранении инфицирования *H. pylori* (Bagheri N. et al., 2018; Tan Y. et al., 2019). Длительное сохранение воспаления вызывает локальную активизацию мутагенеза, приводящую к накоплению драйверных мутаций, инициирующих развитие злокачественных новообразований слизистой желудка. Однако взаимодействие *H. pylori* и макроорганизма не ограничивается исключительно слизистой оболочкой желудочно-кишечного тракта – механизмы, определяющие адаптацию этой бактерии к условиям жизни в человеческом организме, потенциально могут вызывать системные нарушения иммунного равновесия, провоцируя развитие разнообразных заболеваний.

В доступной литературе представлены результаты исследований, указывающих с одной стороны, на способность *H. pylori* участвовать в инициации аутоиммунных реакций (Smyk A.L. et al., 2014; Youssefi M. et al., 2021; Dore M.P. et al., 2023), а с другой стороны, не подтверждающих указанную роль *H. pylori* (Nakamura H. et al., 1996; Versini M. et al., 2015]. Достаточно сложная и неоднозначная картина влияния *H. pylori* на иммунологические процессы организма, представленная в литературных источниках, явилась основанием для выполнения исследований, направленных на оценку иммунологических параметров у больных хроническим гастритом, инфицированных *H. pylori*. Результаты позволят как дополнить представления о роли *H. pylori* в развитии хронического гастрита в целом, так и получить информацию о возможности патогенетического влияния *H. pylori* на развитие аутоиммунных реакций у больных хроническим гастритом.

Цель исследования – провести анализ иммунологических параметров при инфицировании *Helicobacter pylori* в модели *in vitro* и у больных хроническим гастритом.

Задачи исследования:

1. Исследовать реакцию Т-лимфоцитов человека при сокультивировании с *Helicobacter pylori* в модели *in vitro* без участия профессиональных антигенпрезентирующих клеток.
2. Оценить содержание Т-хелперов 17-го типа (Th17) и Т-регуляторных клеток (Treg), а также уровень цитокинов в крови больных хроническим гастритом, инфицированных и не инфицированных *H. pylori*.
3. Провести сравнительный анализ в содержании аутоантител против одноцепочечной и двухцепочечной ДНК (анти-ssДНК-IgG и анти-dsДНК-IgG), ревматоидного фактора (РФ), бета-2-гликопротеина I (anti- β -2-Glycoprotein I-IgM/IgG), тиреоглобулина (анти-ТГ) и тиреопероксидазы (анти-ТПО) в крови больных хроническим гастритом, инфицированных и не инфицированных *H. pylori*.

Научная новизна. Впервые обнаружено, что в модели *in vitro* сокультивирование *H. pylori* с CD4⁺-лимфоцитами периферической крови условно здоровых доноров без участия профессиональных антигенпрезентирующих клеток приводит к увеличению популяции Treg, повышению концентрации интерлейкина-10 (IL-10) и интерферона-гамма (IFN- γ), при этом уровень Th17 не изменяется.

Впервые показано, что в крови больных хроническим гастритом, несмотря на повышение уровня интерлейкина-2 (IL-2) и интерлейкина-23 (IL-23) при детектированном инфицировании *H. pylori*, количество Т-лимфоцитов с фенотипами (Th17 и Treg), относительный уровень мРНК мастер-генов этих популяций (мРНК IL-17A и мРНК FoxP3), а также содержание фактора некроза опухоли-альфа (TNF- α) и мРНК TNF- α не зависят от *H. pylori*-статуса.

Установлено, что в крови больных хроническим гастритом, инфицированных и не инфицированных *H. pylori*, содержание аутоантител против одноцепочечной и двухцепочечной ДНК, β -2-гликопротеина I и ревматоидного фактора не превышает верхнюю границу нормы, что указывает на отсутствие связи между инфицированием данным микроорганизмом и развитием аутоиммунных реакций, сопровождающихся повышением уровня указанных маркеров. При этом уровень аутоантител против β -2-гликопротеина I-IgM/IgG достоверно выше у больных хроническим гастритом, не инфицированных *H. pylori*, в сравнении с инфицированными больными.

Обнаружено достоверное повышение, не выходящее за пределы нормальных значений, уровня аутоантител против тиреоглобулина и тиреопероксидазы в крови инфицированных *H. pylori* больных хроническим гастритом в сравнении с больными, у которых *H. pylori*-инфекция отсутствует.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость работы заключается в получении новых знаний о влиянии *H. pylori* на функциональное состояние CD4⁺ Т-лимфоцитов в условиях *in vitro* и на показатели гуморального и клеточного иммунитета больных хроническим гастритом. Продемонстрированы изменения в количестве и способности к продукции цитокинов популяции Treg клеток при сокультивировании с *H. pylori*, что отражает способность

этого микроба индуцировать супрессорные изменения и, возможно, связано с прямым воздействием патогена на Т-лимфоциты. В крови больных хроническим гастритом, инфицированных *H. pylori*, обнаружено повышенное в сравнении с неинфицированными больными содержание IL-2 и IL-23, отражающее индукцию провоспалительных процессов с возможной аутоиммунной компонентой. Однако *H. pylori*-инфекция у больных хроническим гастритом не сопровождается нарушением баланса Th17/Treg клеток и не приводит к смещению Т-хелперного ответа в сторону Th17 клеток. Анализ уровня аутоантител, являющихся маркерами системной красной волчанки, антифосфолипидного синдрома и ревматоидного артрита, не выявил различий в сравнении с нормой и между больными, инфицированными и не инфицированными *H. pylori*. В то же время аутоиммунные маркеры тиреоидных заболеваний, сохраняясь в пределах нормы, были достоверно повышены у больных – носителей *H. pylori*, что послужило возможным подтверждением роли *H. pylori* в патогенезе аутоиммунных заболеваний, ассоциированных с щитовидной железой.

Практическая значимость работы заключается в получении данных, свидетельствующих о целесообразности выделения *H. pylori*-положительных больных хроническим гастритом в группу риска по развитию тиреоидных аутоиммунных заболеваний. Результаты работы могут использоваться при дальнейшем изучении механизмов иммунного ответа на *H. pylori*-инфекцию, при прогнозировании возможных рисков, обусловленных инфицированием этим микроорганизмом, а также в учебном процессе в рамках курсов по иммунологии и микробиологии, читаемых для студентов биологических и медицинских специальностей.

Методология и методы исследования. Диссертационная работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора) на базе лаборатории иммунохимии. Методологической основой работы стал комплексный анализ иммунологических параметров при инфицировании *Helicobacter pylori* в модели *in vitro* и у больных хроническим гастритом. Проведение исследования было одобрено локальным этическим комитетом ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора (протокол №6 от 25.11.2021). Для достижения цели исследования и решения поставленных задач были использованы современные микробиологические, иммунологические, молекулярно-генетические и статистические методы. Полученные результаты систематизированы и обсуждены в сравнении с литературными данными. Исходя из результатов исследования, сформулированы выводы и практические рекомендации.

Положения, выносимые на защиту:

1. Сокультивирование *H. pylori* и Т-лимфоцитов периферической крови условно здоровых доноров в модели *in vitro* приводит к увеличению популяции Treg и Т-хелперов 1-го типа (Th1) при неизменном количестве Th17 и усилении продукции IL-10 и IFN- γ .
2. Содержание Treg и Th17 клеток в периферической крови больных хроническим гастритом, инфицированных и не инфицированных *H. pylori*, не различается.

3. Медиана уровня аутоантител против одноцепочечной и двухцепочечной ДНК, бета-2-гликопротеина I и ревматоидного фактора в крови больных хроническим гастритом не превышает границ нормы и не зависит от инфицирования *H. pylori*.

4. В периферической крови больных с *H. pylori*-ассоциированным хроническим гастритом уровень IL-2, IL-23 и аутоантител против тиреоглобулина и тиреопероксидазы достоверно значимо выше, чем у больных с хроническим гастритом, не ассоциированным с *H. pylori*.

Степень достоверности и апробация результатов. Результаты получены с помощью стандартизованных методов, на выборках достаточного объема и воспроизведены в нескольких сериях экспериментов. Для оценки достоверности выявленных различий использованы адекватные статистические критерии. Результаты экспериментов проанализированы и сопоставлены с известными клиническими данными других исследователей. Сформулированные в диссертации научные положения и выводы согласуются с известными фактами, обоснованными теоретическими решениями и экспериментальными данными и не противоречат известным положениям иммунологии.

Результаты, полученные в ходе выполнения работы, неоднократно представлялись на конференциях различного уровня: Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 95-летию кафедры микробиологии ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации (Санкт-Петербург, 2018 г.); XXIII Нижегородской сессии молодых ученых (Нижний Новгород, 2018 г.); 71, 73, 76 Всероссийских школах-конференциях молодых ученых с международным участием «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Нижний Новгород, 2018, 2020, 2023 гг.); Всероссийской научно-практической конференции «Научное обеспечение противоэпидемической защиты населения: актуальные проблемы и решения» (Нижний Новгород, 2019 г.); Всероссийской научно-практической конференции «Эпидемиологический надзор за актуальными инфекциями: новые угрозы и вызовы» к 100-летию со дня рождения академика И.Н. Блохиной (Нижний Новгород, 2021 г.); Межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы эпидемиологии и гигиены: наука и практика. Ответы на глобальные вызовы» (Нижний Новгород, 2022 г.); XV Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского (Москва, 2023 г.).

Личный вклад автора. Автор принимал непосредственное участие в выполнении всех этапов диссертационного исследования. Создание основной идеи, планирование научной работы, включая формулировку рабочей гипотезы, цели, задач работы, определение методологии диссертационного исследования, интерпретация и анализ полученных результатов, а также подготовка публикаций по теме диссертации осуществлялась соискателем совместно с научным руководителем – доктором биологических наук, профессором В.В. Новиковым. Анализ, систематизация, обобщение литературных данных по изучаемой проблеме, экспериментальные исследования, статистическая обработка данных, оформление рукописи диссертации и автореферата, формулировка положений, выносимых на защиту, выводов и практических рекомендаций, представление результатов в виде докладов на конференциях осуществлялись соискателем лично.

Внедрение результатов исследования в практику. Создан и внедрен на местном уровне (ФБУН ННИИЭМ им. академика. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора) результат интеллектуальной деятельности (ноу-хау) «Способ культивирования *Helicobacter pylori*», который используется в работе лаборатории иммунохимии.

Основные результаты диссертационного исследования и методологические подходы внедрены в научно-исследовательскую работу лаборатории иммунохимии, а также используются в комплексе обследования пациентов с хроническим гастритом, проходящих лечение в Клинике инфекционных болезней ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора.

Публикации по теме диссертационной работы. Результаты диссертации опубликованы в 17 печатных работах, из них 4 статьи в научных изданиях, рецензируемых ВАК по специальности 3.2.7. Иммунология, и/или индексируемых в Scopus, RSCI.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 149 страницах, содержит 3 таблицы и 19 рисунков, включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключение, выводы, практические рекомендации, список сокращений и условных обозначений и список литературы (366 источников, из них 27 отечественных и 339 иностранных).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Материалом исследований служили образцы тканей желудка от больного хроническим гастритом (n=4); образцы периферической крови от взрослых условно здоровых доноров (n=9); образцы венозной крови и желудочного сока от больных (n=350) хроническим гастритом. Все обследованные подписали информированное согласие на использование их биологического материала в научном исследовании. Проведение данного исследования было одобрено локальным этическим комитетом ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора (протокол № 6 от 25.11.2021).

Выделение культуры *Helicobacter pylori*. При проведении эзофагогастродуоденоскопии от больного хроническим гастритом были получены четыре образца тканей желудка. Один из биоптатов использовали для проведения быстрого уреазного теста (тест-система Хелпил[®], Россия), а остальные механически измельчали и высевали на колумбийский агар (с добавлением 10% донорской крови и антибиотиков – 10 мкг/л ванкомицина, 5 мг/л триметоприма, 2 мг/л нистатина) с целью выделения чистой культуры *H. pylori*. Чашки с посевами помещали в герметичные пакеты для инкубации, где с помощью газогенерирующих пакетов (Campy Pak, Becton Dickinson, США) создавали микроаэрофильные условия (O₂ – 5 %, CO₂ – 10 %, N₂ – 80 %). Посевы инкубировали в термостате в течение 7-и суток при температуре +37 °C и влажности 95 %. Видовую идентификацию выделенной культуры осуществляли с помощью масс-спектрометрического анализа с использованием MALDI-TOF MS серии Autoflex Speed LRF (Bruker Daltonics, Германия). Достоверность идентификации оценивали по полученным значениям Score (коэффициент соответствия), сравнивая с данными спектров референсной библиотеки BioTyper 3.0. Достоверной

считали идентификацию на уровне вида при значении Score 2,000–3,000. Колонии с *H. pylori* использовали для приготовления бактериальных суспензий и сокультивирования с CD4⁺ Т-лимфоцитами в экспериментах *in vitro*.

Получение фракции CD4⁺ Т-лимфоцитов. Из образцов гепаринизированной периферической крови от условно здоровых доноров выделяли популяцию CD4⁺ Т-лимфоцитов. Используя метод, основанный на седиментации в одноступенчатом градиенте фиколла плотностью 1077 г/см³ (ДиаЭм, Россия), получали суспензию мононуклеарных клеток и подсчитывали их количество в камере Горяева по общепринятой методике. Жизнеспособность клеток определяли с использованием 0,4 %-го раствора трипанового синего (ПанЭко, Россия). Далее суспензию с мононуклеарами центрифугировали (450g, 15 минут), супернатант удаляли, а осадки с клетками ресуспендировали и разводили в полной питательной среде (RPMI-1640 с добавлением 10 % инактивированной фетальной телячьей сыворотки (Biochrome, Германия) и 300 мг/л L-глутамина (ПанЭко, Россия) и использовали для разделения методом адгезии на пластике на моноцитарную и лимфоцитарную фракции. В дальнейшей работе использовали лимфоцитарную фракцию, из которой выделяли популяцию CD4⁺ Т-клеток методом иммуномагнитной сепарации с негативной селекцией с применением набора EasySep™ Human CD4⁺ T Cell Enrichment Kit (Stemcell technologies, USA) в соответствии с инструкцией производителя. Чистоту полученных клеток контролировали с помощью проточной лазерной цитофлуориметрии с использованием Anti-Human CD4 Antibody, Clone OKT4, FITC (Stemcell technologies, USA).

Стимуляция лимфоцитов. Для сокультивирования использовали соотношения CD4⁺ Т-лимфоцитов к *H. pylori* равные 1:10, 1:20 и 1:50. Часть лимфоцитов сокультивировали с бактериями в присутствии моноклональных антител к CD3 и CD28 (eBioscience, США и Beckman Coulter, Франция). Культуры клеток инкубировали 18–24 часа в CO₂-инкубаторе при 37 °C и 5 % CO₂. По окончании инкубации при помощи проточной лазерной цитофлуориметрии на приборе FACS Calibur (Becton Dickinson, США) оценивали относительное количество клеток фенотипа CD4⁺CD161⁺ и CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺. Параллельно в супернатантах клеточных культур с использованием иммуноферментного анализа (ИФА) оценивали концентрацию IFN-γ и IL-10 с помощью тест-наборов («Гамма-интерферон-ИФА-БЕСТ» и «Интерлейкин-10-ИФА-БЕСТ», Вектор-Бест, Россия) в соответствии с инструкциями производителя.

Молекулярно-биологические исследования. В образцах желудочного сока больных хроническим гастритом определяли ДНК *Helicobacter pylori* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени с использованием комплекта реагентов «РеалБест ДНК *Helicobacter pylori*» («Вектор-Бест», Россия) согласно инструкции производителя. В зависимости от результата анализа ПЦР были сформированы две группы: основная (больные с *H. pylori*-ассоциированным хроническим гастритом) и группа сравнения (больные с *H. pylori*-неассоциированным хроническим гастритом). При помощи проточной лазерной цитофлуориметрии на приборе CytoFLEX (Beckman Coulter, США) в крови больных хроническим гастритом оценивали относительное количество клеток фенотипа CD4⁺CD161⁺ и CD4⁺FoxP3⁺ как (%) от общего числа CD4⁺ Т-лимфоцитов. Параллельно методом полимеразной цепной реакции с обратной

транскрипцией в реальном времени определяли относительный уровень мРНК IL-17A, мРНК FoxP3, мРНК TNF- α . Для выделения нуклеиновых кислот из образцов периферической крови больных хроническим гастритом использовали коммерческий набор «Рибо-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва). Для удаления дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из препарата очищенных нуклеиновых кислот применяли набор реагентов DNase I, RNase-free (Thermo Fisher scientific), согласно инструкции производителя. Полученный препарат очищенной рибонуклеиновой кислоты (РНК) использовали в реакции обратной транскрипции. Готовили реакционную смесь (2,5 мкг тотальной РНК, 2 мкл 20 μ M Oligo(dT)₁₅-primer (Евроген, Россия), 6,5 мкл деионизированной воды, свободной от нуклеаз), которую прогревали 2 минуты при 70 °C, затем охлаждали и добавляли 4 мкл 5x First standard buffer, 2 мкл dNTP_{mix} (10mM), 2 мкл DDT (DL-Dithiothreitol, 20 mM) и 1 мкл M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (100 ед. акт.). Пробу инкубировали 60 минут при 37 °C. Реакцию останавливали нагревом реакционной смеси до 70 °C в течение 10 минут с последующим охлаждением во льду. Продукт синтеза первой цепи комплементарной ДНК (кДНК) использовали в ПЦР в реальном времени. В пробирки вносили 23 мкл на образец реакционной смеси (20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,4 mM dNTP; 10 пг прямого праймера, 10 пг обратного праймера, 10 пг флуоресцентно меченого зонда как для исследуемой мРНК IL-17A, мРНК FoxP3, мРНК TNF- α , так и для референсной мРНК YWHAZ), 2 мкл кДНК и TaqF ДНК полимеразы 5 единиц активности (Amplysens, Россия). Нуклеотидные последовательности используемых праймеров и зондов представлены в *Таблице 1*. Уровень относительной экспрессии генов-мишеней оценивали в относительных единицах по методу «дельта-дельта Ct, 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}» (Livak K.J. et al., 2001) с учетом эффективности реакции.

Таблица 1 – Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов для определения уровней мРНК исследуемых генов

Ген	Олигонуклеотид	Последовательность (5'→3')
IL-17	Прямой праймер	TCTGTGATCTGGGAGGCAAAGT
	Обратный праймер	GGAGTTGGGGCAGTGTGGAG
	Зонд	(ROX)TGGAACGTGGACTACCACATGAACTCT(BHQ-2)
FoxP3	Прямой праймер	GAGAAGCTGAGTGCCATGCA
	Обратный праймер	GGAGCCCTTGTCGGATGAT
	Зонд	(ROX)TGCCATTTTCCCAGCCAGGTGG(BHQ-2)
TNF- α	Прямой праймер	CTCTTCTCCTTCCTGATCTGT
	Обратный праймер	TTGAGGGTTTGCTACAACATGG
	Зонд	(ROX)AGAGTTCCCCAGGGACCTCTCTCTAATC(BHQ-2)
YWHAZ	Прямой праймер	TGCAATGATGTACTGTCTCT
	Обратный праймер	ACTGATCGACAATCCCTTTC
	Зонд	(CY5)ATTACTACCGTTACTTGGCTGAGGTTGCC(BHQ-2)

Иммуноферментный анализ. Используя твердофазный иммуноферментный анализ, согласно инструкции по применению тест-наборов, в плазме крови определяли концентрацию IL-2 («Интерлейкин-2-ИФА-БЕСТ», Россия), фактора некроза опухоли альфа («Альфа-ФНО-ИФА-

БЕСТ», Россия), IL-23 («Human IL-23 Platinum ELISA»; «eBioscience», США), уровень аутоантител против односпиральной и двухспиральной ДНК («Векто-ssДНК-IgG», «Векто-dsДНК-IgG», Россия), ревматоидного фактора («ВектоРевматоидный фактор класса М», Россия), β -2-гликопротеина I («Anti-beta-2-Glycoprotein I IgG/IgM», Германия), тиреоглобулина и тиреопероксидазы («Анти-ТГ-ИФА-БЕСТ», «Анти-ТПО-ИФА-БЕСТ», Россия).

Статистический анализ. Статистическую обработку данных осуществляли с использованием компьютерной программы GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., США). Перед сравнением данных проводили проверку гипотез нормальности распределения количественных признаков в каждой из групп с использованием критериев Колмогорова-Смирнова, Шапиро-Уилка. Для проверки статистических гипотез применяли двусторонний U-критерий Манна-Уитни и t-тест. Статистические характеристики переменных, соответствовавших нормальному распределению, представлены в виде $M \pm m$, где M – средняя арифметическая, m – стандартная ошибка средней. Во всех остальных случаях – в виде Me (25 %–75 %) – медианы, нижнего квартиля (25 %) и верхнего квартиля (75 %). При $p \leq 0,05$ различия считали достоверными.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние *Helicobacter pylori* на содержание Th17 и IFN- γ в культурах лимфоцитов. С целью оценки возможного влияния *H. pylori* на развитие аутоиммунных проявлений на начальном этапе работы была проведена серия экспериментов по совместному культивированию *H. pylori* с CD4⁺ Т-лимфоцитами человека в модели *in vitro*. В культурах CD4⁺ Т-лимфоцитов оценивалось относительное количество клеток фенотипа CD4⁺CD161⁺ (Th17), повышенное содержание которых, по мнению ряда авторов, может быть связано с некоторыми аутоиммунными заболеваниями (Kabir S., 2014; Tan Y. et al., 2019). Было показано, что в контрольной культуре интактных CD4⁺ Т-лимфоцитов (К) относительное количество CD4⁺CD161⁺-клеток составило $17,34 \pm 2,07$ %. Добавление к CD4⁺-лимфоцитам различных концентраций *H. pylori* не приводило к достоверному повышению клеток фенотипа CD4⁺CD161⁺ в культурах лимфоцитов и составило $16,20 \pm 3,58$ %, $19,10 \pm 3,00$ %, $22,55 \pm 1,43$ % для соотношений 1:10, 1:20 и 1:50 (Рисунок 1А).

Исследовано влияние *H. pylori* на реакцию CD4⁺ Т-лимфоцитов в присутствии моноклональных антител к компоненту Т-клеточного рецепторного комплекса CD3 и молекуле костимуляции CD28. Данные антитела, связываясь с белками на поверхности Т-лимфоцитов, способны инициировать сигналы, имитирующие стимуляцию антигенпрезентирующих клеток через Т-клеточный рецептор (Trickett A. et al., 2003). В контрольной культуре CD4⁺ Т-лимфоцитов (К1), не стимулированных *H. pylori*, но с добавлением антител к CD3 и CD28, относительное количество клеток фенотипа CD4⁺CD161⁺ (Th17) составило $18,21 \pm 3,90$ % от всех CD4⁺ Т-лимфоцитов и достоверно не отличалось от контрольной культуры интактных CD4⁺-лимфоцитов (К) (Рисунок 1Б). Добавление к CD4⁺ Т-клеткам различных концентраций *H. pylori* совместно с антителами к CD3 и CD28 также не приводило к достоверным изменениям относительного количества CD4⁺CD161⁺ клеток в сравнении с контрольными культурами лимфоцитов (К и К1) и

составило $16,20 \pm 3,58 \%$, $19,10 \pm 3,00 \%$, $22,55 \pm 1,43 \%$ для соотношений 1:10, 1:20 и 1:50 соответственно (Рисунок 1Б).

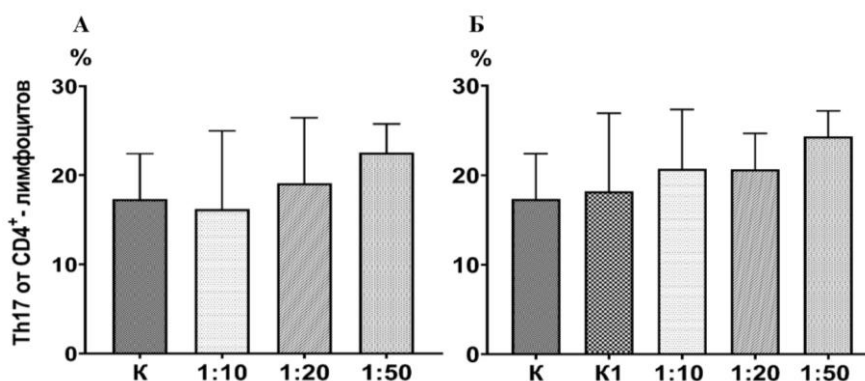


Рисунок 1 – Относительное количество клеток фенотипа $CD4^+CD161^+$ (Th17) в культурах $CD4^+$ Т-лимфоцитов после добавления: (А) *H. pylori*; (Б) *H. pylori* и антител к CD3-антигену и молекуле костимуляции CD28

Примечание: К (Контроль) – $CD4^+$ Т-лимфоциты, не стимулированные *H. pylori*; К1 (Контроль 1) – $CD4^+$ Т-лимфоциты + антитела к CD3 и CD28; 1:10, 1:20, 1:50 – соотношения количества $CD4^+$ Т-лимфоцитов к количеству клеток *H. pylori*.

Субпопуляция Th17 не является единственным индуктором и участником аутоиммунных реакций. В связи с этим, по продукции IFN- γ было оценено влияние *H. pylori* вышеописанных условиях культивирования на генерацию Т-хелперов 1-го типа (Th1). Обнаружено, что сокультивирование *H. pylori* с Т-клетками как в отсутствии моноклональных антител к CD3 и CD28, так и в их присутствии, приводило к достоверному повышению концентрации IFN- γ в сравнении с культивированием только контрольных клеток (К и К1) (Рисунок 2).

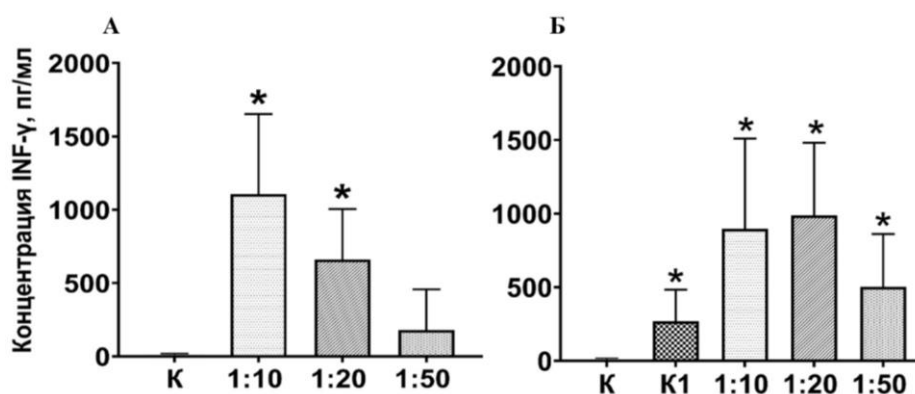


Рисунок 2 – Концентрация IFN- γ в супернатантах клеточных культур после сокультивирования $CD4^+$ Т-лимфоцитов с: (А) *H. pylori*; (Б) *H. pylori* и антителами к CD3-антигену и молекуле костимуляции CD28

Примечание: К (Контроль) – $CD4^+$ Т-лимфоциты, не стимулированные *H. pylori*; К1 (Контроль 1) – $CD4^+$ Т-лимфоциты + антитела к CD3 и CD28; 1:10, 1:20, 1:50 – соотношения количества $CD4^+$ Т-лимфоцитов к количеству клеток *H. pylori*; * ($p < 0,05$) – достоверные отличия от К.

В контрольной культуре интактных клеток (К) концентрация IFN- γ составила $10,00 \pm 4,08$ пг/мл. В то же время сокультивирование $CD4^+$ Т-лимфоцитов с *H. pylori* в соотношении 1:10, 1:20 и 1:50 приводило к достоверному повышению концентрации IFN- γ в супернатантах

клеточных культур и составило $1107,00 \pm 315,20$, $660,00 \pm 198,60$ и $180,00 \pm 160,10$ пг/мл соответственно. Добавление антител к CD3 и CD28 к контрольной культуре лимфоцитов, не стимулированных *H. pylori* (K1), приводило к достоверному повышению концентрации IFN- γ до $270,00 \pm 106,29$ пг/мл в сравнении с К. В то же время сокультивирование CD4⁺ Т-лимфоцитов с *H. pylori* в присутствии моноклональных антител к CD3 и CD28 приводило к достоверному повышению концентрации IFN- γ в супернатантах клеточных культур и составило $897,49 \pm 306,10$, $987,45 \pm 247,10$ и $502,50 \pm 180,00$ пг/мл для соотношений количества лимфоцитов к количеству клеток *H. pylori* (1:10, 1:20 и 1:50).

Таким образом, было установлено, что *H. pylori* в модели *in vitro* при отсутствии в культурах профессиональных антигенпрезентирующих клеток не индуцировал CD4⁺ Т-лимфоциты, выделенные из периферической крови условно здоровых доноров, дифференцироваться в сторону повышения клеток фенотипа CD4⁺CD161⁺ (Th17), и этот эффект не зависел от присутствия или отсутствия в культурах моноклональных антител к CD3-антигену и молекуле костимуляции CD28. Вероятно, что ответная реакция Т-хелперов на сокультивирование с *H. pylori* при ее провоспалительном течении проходит по Th1 типу, без существенного вовлечения Th17 клеток, поскольку стимуляция CD4⁺ Т-лимфоцитов различными концентрациями бактерий приводила к достоверному повышению IFN- γ в супернатантах клеточных культур в сравнении с концентрацией IFN- γ в контрольной культуре интактных CD4⁺ Т-лимфоцитов, что свидетельствует о функциональной активации Th1 клеток в ответ на *H. pylori*.

Полученные данные соотносятся с описанными в литературе сообщениями, согласно которым протекание *H. pylori*-ассоциированных гастритов приводит к Th1-доминантному ответу, и воспаление слизистой оболочки желудка связано с повышенной продукцией IFN- γ (Bagheri N. et al., 2018; Синяков А.А. и соавт., 2019; Смирнова О.В. и соавт., 2020).

Влияние *Helicobacter pylori* на содержание Treg и IL-10 в культурах лимфоцитов. На последующем этапе работы исследовано влияние *H. pylori* в модели *in vitro* на содержание клеток фенотипа CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (Treg) в культурах CD4⁺ Т-лимфоцитов. Было показано, что в контрольной культуре интактных CD4⁺ Т-лимфоцитов (К) относительное количество Treg составило $5,30 \pm 1,60$ %. Добавление к CD4⁺ Т-клеткам различных концентраций *H. pylori* приводило к достоверному повышению относительного количества Treg и составило $10,56 \pm 5,59$ %, $9,28 \pm 4,69$ %, $8,19 \pm 4,06$ % для соотношений 1:10, 1:20 и 1:50 (Рисунок 3А). При этом относительное количество Treg в контрольной культуре лимфоцитов без *H. pylori*, но с добавлением антител к CD3 и CD28 (K1) достоверно повышалось до $12,93 \pm 2,04$ % в сравнении с контрольной культурой интактных клеток (К) (Рисунок 3Б). В то же время введение в культуры лимфоцитов *H. pylori* в разных концентрациях совместно с антителами к CD3 и CD28 не приводило к дополнительному достоверному повышению относительного количества Treg в сравнении с K1 и составило $12,98 \pm 2,50$ %, $12,39 \pm 1,71$ %, $12,35 \pm 1,10$ % для соотношений 1:10, 1:20 и 1:50 соответственно.

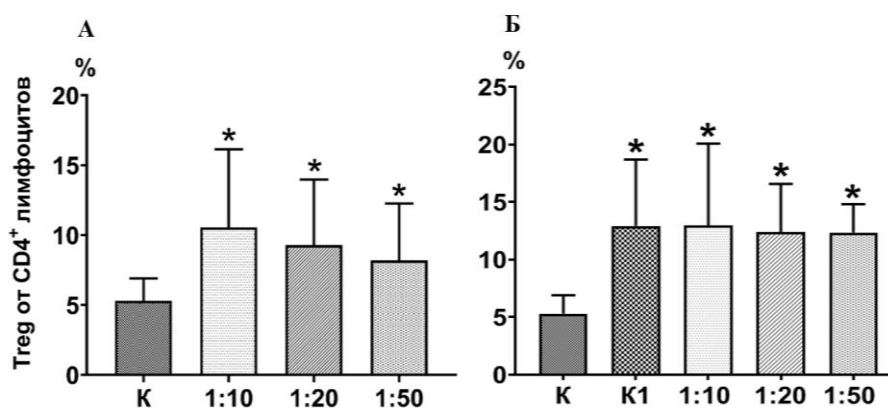


Рисунок 3 – Относительное количество клеток фенотипа $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ (Treg) в культурах $CD4^+$ Т-лимфоцитов после добавления: (А) *H. pylori*; (Б) *H. pylori* и антител к CD3-антигену и молекуле костимуляции CD28

Примечание: К (Контроль) – $CD4^+$ Т-лимфоциты, не стимулированные *H. pylori*; K1 (Контроль 1) – $CD4^+$ Т-лимфоциты + антитела к CD3 и CD28; 1:10, 1:20, 1:50 – соотношения количества $CD4^+$ Т-лимфоцитов к количеству клеток *H. pylori*; * ($p < 0,05$) – достоверные отличия от К.

Параллельно в супернатантах клеточных культур оценивалась продукция IL-10 – важного супрессорного цитокина Treg-клеток. В контрольной культуре интактных клеток (К) медиана концентрации IL-10 составила 0,00 [0,00–16,50] пг/мл. Добавление к $CD4^+$ Т-лимфоцитам суспензий *H. pylori* приводило к достоверному повышению концентрации IL-10 в супернатантах клеточных культур и составило 230,00 [103,50–306,50], 135,00 [68,50–720,00] и 75,00 [35,00–526,50] пг/мл для соотношений количества лимфоцитов к количеству клеток *H. pylori*, равных 1:10, 1:20 и 1:50 (Рисунок 4А). В то же время добавление к культурам $CD4^+$ Т-клеток *H. pylori* (1:10, 1:20 и 1:50) совместно с антителами к CD3 и CD28 приводило к дополнительному достоверному повышению концентрации IL-10 в супернатантах клеточных культур и составило 345,00 [147,50–464,00], 430,00 [96,00–471,50] и 210,00 [94,00–333,50] пг/мл соответственно (Рисунок 4Б).

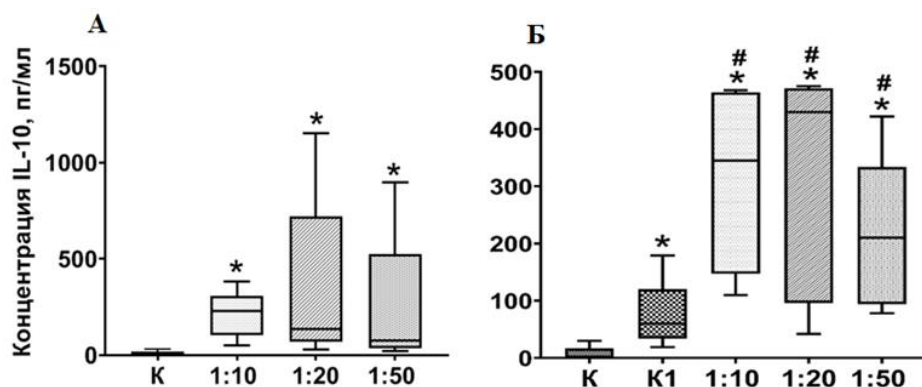


Рисунок 4 – Концентрация IL-10 в супернатантах клеточных культур после сокультивирования $CD4^+$ Т-лимфоцитов с: (А) *H. pylori*; (Б) *H. pylori* и антителами к CD3-антигену и молекуле костимуляции CD28

Примечание: К (Контроль) – $CD4^+$ Т-лимфоциты, не стимулированные *H. pylori*; K1 (Контроль 1) – $CD4^+$ Т-лимфоциты + антитела к CD3 и CD28; 1:10, 1:20, 1:50 – соотношения количества $CD4^+$ Т-лимфоцитов к количеству клеток *H. pylori*; * ($p < 0,05$) – достоверные отличия от К; # ($p < 0,05$) – достоверные отличия от K1.

В условиях данного эксперимента было показано, что воздействие *H. pylori* на CD4⁺ Т-лимфоциты периферической крови условно здоровых доноров приводило к активации клеток фенотипа CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (Treg) и повышенной экспрессии IL-10. Данный эффект не зависел от присутствия в культурах лимфоцитов профессиональных антигенпрезентирующих клеток. По-видимому, воздействие *H. pylori* затрагивало клетки, исходно коммитированные к развитию в сторону Treg, так как стимуляция антителами к CD3 и CD28 антигену «поглощала» эффект от введения бактерий: культуры, стимулированные только антителами, а также антителами одновременно с *H. pylori* достоверно не отличались по содержанию Treg.

В то же время из литературы известно, что естественные Treg клетки экспрессируют на своей мембране Toll-подобные рецепторы (TLRs) и, следовательно, могут быть активированы непосредственно возбудителем инфекции, несущим соответствующий лиганд на своей поверхности. Эксперименты *in vitro* указывают на то, что естественные Treg приобретают способность к пролиферации после стимуляции их TLR лигандами микроорганизмов (Ярилин А.А., 2006). Мы предположили, что *H. pylori* может выступать в роли активатора Treg клеток посредством взаимодействия паттернов микроба или продуктов его метаболизма с Toll-подобными рецепторами на мембране Т-лимфоцитов. Таким образом, индуцированные *H. pylori* Treg клетки ограничивают развитие антимикробного ответа и способствуют персистенции возбудителя в организме хозяина.

Содержание Th17 и Treg и экспрессия мРНК IL-17A и мРНК FoxP3 в крови больных хроническим гастритом. Эксперименты, проведенные в условиях *in vitro*, не позволили выявить молекулярные и клеточные механизмы, которые могли бы указывать на возможность инициации аутоиммунных процессов со стороны *H. pylori*. В связи с этим в дальнейшем было проведено изучение возможности такого действия на системном уровне. В крови больных хроническим гастритом, инфицированных *H. pylori* (основная группа) в сопоставлении с не инфицированными *H. pylori* больными (группа сравнения) оценивалось относительное количество клеток фенотипа CD4⁺CD161⁺ (Th17) и CD4⁺FoxP3⁺ (Treg), а также уровень мРНК IL-17A и мРНК FoxP3. Согласно полученным результатам, в крови больных хроническим гастритом вне зависимости от *H. pylori*-статуса отсутствовали достоверные различия в содержании CD4⁺CD161⁺ и CD4⁺FoxP3⁺ клеток, а также в экспрессии маркерных генов (мРНК IL-17A и мРНК FoxP3) этих субпопуляций лимфоцитов. Медиана относительного количества клеток фенотипа CD4⁺CD161⁺ и CD4⁺FoxP3 в крови больных основной группы составила 9,94 [8,52–12,06] % и 2,36 [1,34–4,69] %, а для группы сравнения 9,38 [7,46–11,25] % и 2,31 [1,87–4,74] % от всех CD4⁺-лимфоцитов соответственно (Рисунок 5).

Ранее было показано, что содержание Th17 (CD3⁺CD4⁺CD161⁺CD45RO⁺) клеток в крови здоровых доноров находится в пределах 10-21 % от всех CD3⁺CD4⁺-лимфоцитов (Топтыгина А.П. и соавт., 2017). Таким образом, *H. pylori*-инфекция у больных хроническим гастритом, согласно полученным данным, не индуцировала чрезмерный провоспалительный Th17 ответ, который потенциально мог быть связан с развитием аутоиммунных проявлений, поскольку содержание CD4⁺CD161⁺-клеток у лиц с хроническим гастритом и *H. pylori*-инфекцией не превышало представленные в литературе контрольные показатели. В то же время содержание Treg у больных

хроническим гастритом, вне зависимости от *H. pylori*-статуса, было практически одинаковым и не превышало 5 % от всех CD4⁺ Т-лимфоцитов периферической крови, что соответствует нормальному содержанию Treg в крови условно здоровых доноров (Кравченко П.Н. и соавт., 2013).

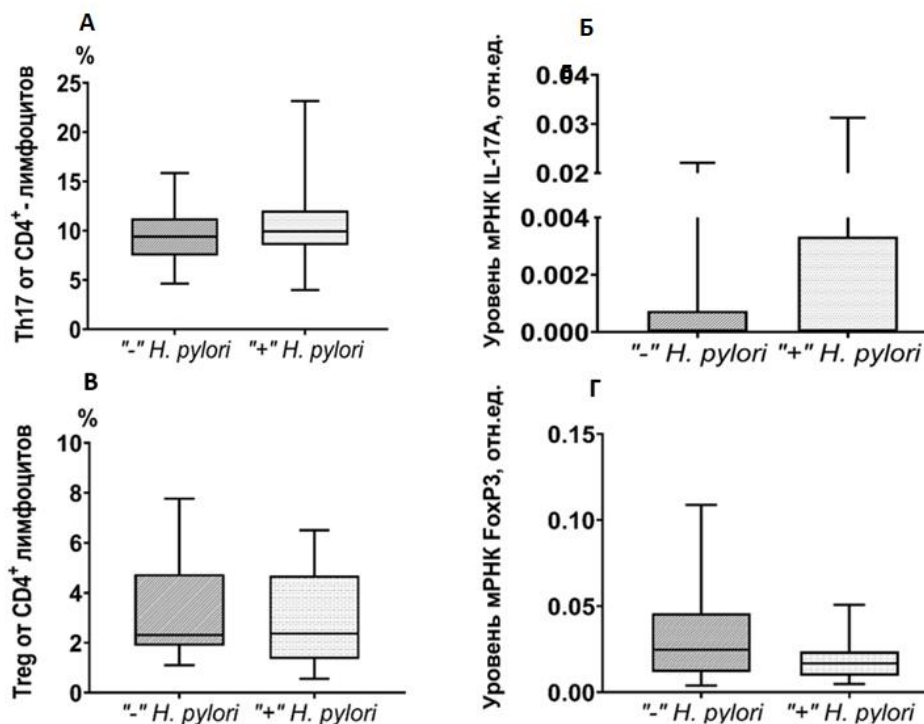


Рисунок 5 – Относительное количество клеток фенотипа: (А) CD4⁺CD161⁺ (Th17) и (В) CD4⁺FoxP3⁺ (Treg); относительный уровень: (Б) мРНК IL-17А и (Г) и мРНК FoxP3 в периферической крови больных с хроническим гастритом

Примечание: «-» *H. pylori* – группа сравнения; «+» *H. pylori* – основная группа.

Заметим, что представленные выше результаты о повышении уровня Treg при сокультивировании с *H. pylori* в условиях *in vitro*, возможно, являются следствием проявления пластичности фенотипических и функциональных свойств лимфоцитов при воздействии таких инфекционных агентов как *H. pylori*. Однако *in vivo* эти изменения в наших исследованиях не проявлялись. Системный иммунитет обычно является отдаленным результатом событий, происходящих в тканях, и имеет собственный алгоритм проявления реакций на нарушения гомеостаза инфекционного, аутоиммунного или какого-либо иного характера (Jang T.J., 2010; Kandulski A. et al., 2010).

Содержание IL-2, IL-23, TNF-α и мРНК TNF-α в крови больных хроническим гастритом.

Развитие и течение хронического воспаления в слизистой оболочке желудка связывают с провоспалительными цитокинами, продукция которых индуцируется в ответ на *H. pylori*-инфекцию (Акбиева Д.С., 2017). В первой части работы мы обнаружили достоверное повышение концентрации IFN-γ – ключевого цитокина Th1 в супернатантах клеточных культур при совместном культивировании CD4⁺ Т-лимфоцитов человека с *H. pylori* в условиях *in vitro*. В то же время к основным провоспалительным цитокинам Th1 клеток относят IL-2, который способствует

дифференцировке Т-клеток в эффекторные клетки и Т-клетки памяти (Liao W. et al., 2013). В литературе также имеются данные, свидетельствующие о том, что дендритные клетки в ответ на *H. pylori*-инфекцию способны продуцировать повышенные уровни IL-23 – ключевого цитокина, необходимого для поддержания и экспансии Th17 клеток (Mitchell P. et al., 2007; Khamri W. et al., 2010; Jr D.J.H et al., 2012).

В рамках настоящей работы в крови больных хроническим гастритом, инфицированных *H. pylori* (основная группа), в сопоставлении с неинфицированными больными (группа сравнения) оценивалось содержание IL-2 и IL-23. Было обнаружено, что у всех лиц вне зависимости от *H. pylori*-статуса концентрация указанных цитокинов была выше нормы (Рисунок 6). При этом у больных основной группы медиана содержания IL-2 и IL-23 составила 18,11 [17,67–19,34] и 208,9 [164,4–242,3] пг/мл и была достоверно выше относительно группы сравнения 16,86 [16,21–17,28] и 146,2 [128,3–179,9] пг/мл (Рисунок 6).

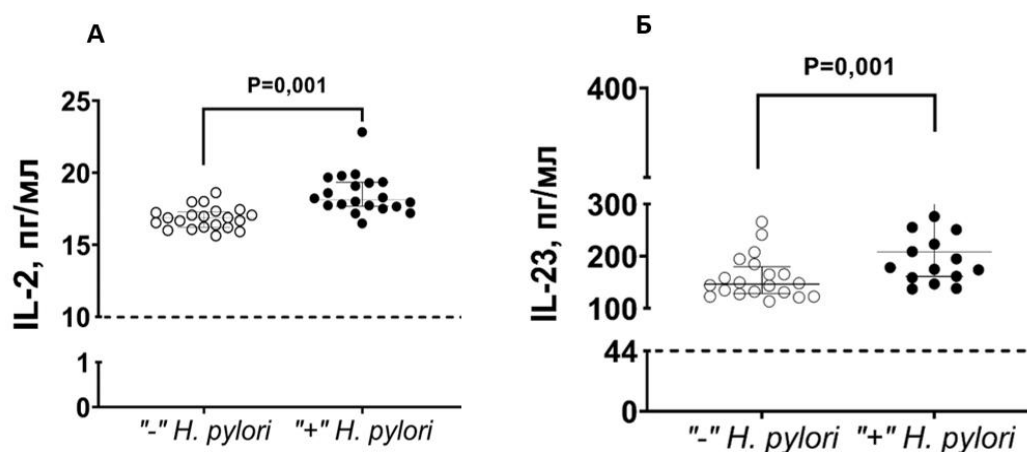


Рисунок 6 – Концентрация (А) IL-2 и (Б) IL-23 в плазме крови больных хроническим гастритом

Примечание: «-» *H. pylori* – группа сравнения; «+» *H. pylori* – основная группа; ----- – граница нормы.

Увеличение концентрации IL-2 и IL-23 у всех лиц с хроническим гастритом, по-видимому, связано с активным воспалительным процессом, происходящим в слизистой оболочке желудка. В то же время, несмотря на повышенную концентрацию IL-23, обнаруживаемую в крови больных хроническим гастритом, мы не выявили изменений в количественном и функциональном состоянии популяции Th17 клеток. Тем не менее, вероятное участие IL-23 в регуляции хронического воспаления слизистой оболочки желудка при разбалансированности иммунных процессов и изменении статуса Th17 звена потенциально может привести к формированию аутоиммунных реакций.

Фактор некроза опухоли альфа (TNF-α) является многофункциональным провоспалительным цитокином, который наряду с IL-2 и IL-23 играет ключевую роль в комплексной регуляции воспалительных и иммунных процессов в организме человека при бактериальных, вирусных и аутоиммунных заболеваниях (Yamamoto T. et al., 2004; Sitep R.R. et al., 2018). В крови больных хроническим гастритом, инфицированных *H. pylori*, в сопоставлении с неинфицированными

больными оценивалось содержание TNF- α и уровень мРНК TNF- α . Было показано, что у всех лиц вне зависимости от *H. pylori*-статуса наблюдался повышенный уровень TNF- α и мРНК TNF- α (Рисунок 7). У больных основной группы медиана содержания TNF- α составила 15,04 [7,64–114,00] пг/мл и достоверно не отличалась от таковой 11,34 [7,59–86,67] пг/мл в группе сравнения. В то же время уровень мРНК TNF- α для больных основной группы составил 0,082 [0,036–0,144], а для группы сравнения 0,058 [0,022–0,117] относительных единиц. Достоверных различий в экспрессии мРНК TNF- α между группами не обнаруживалось.

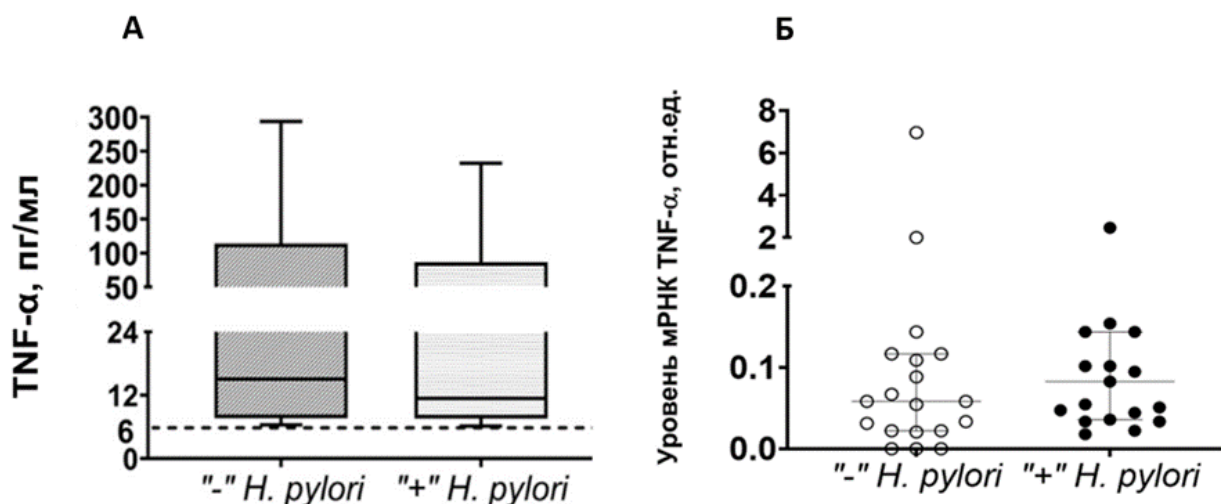


Рисунок 7 – Концентрация (А) TNF- α и относительный уровень (Б) мРНК TNF- α в периферической крови больных хроническим гастритом

Примечание: «-» *H. pylori* – группа сравнения; «+» *H. pylori* – основная группа; ----- – граница нормы.

Отсутствие различий в содержании TNF- α и кодирующей его мРНК между инфицированными и не инфицированными *H. pylori* больными хроническим гастритом на фоне повышенной концентрации IL-23 указывает, с одной стороны, на участие этого цитокина в развитии воспалительных процессов у больных хроническим гастритом независимо от инфицирования *H. pylori*, а с другой стороны, позволяет предположить возможную связь между его уровнем и скрытыми механизмами развития аутоиммунных процессов, в том числе механизмами продукции аутоантител.

Сравнительный анализ уровня аутоантител в крови больных хроническим гастритом.

Известно, что наряду со сдвигами в состоянии клеточного иммунитета развитие аутоиммунных заболеваний сопровождаются появлением в крови аутоантител, имеющих как прогностическое, так и диагностическое значение. Заключительный раздел диссертационной работы был посвящен определению уровня аутоантител – маркеров наиболее распространенных аутоиммунных заболеваний (системной красной волчанки (СКВ), антифосфолипидного синдрома (АФС), ревматоидного артрита (РА) и тиреоидных аутоиммунных заболеваний) в крови больных хроническим гастритом, инфицированных *H. pylori*, в сравнении с не инфицированными больными.

В литературе приводятся неоднозначные и противоречивые данные, касающиеся способности *H. pylori* участвовать в инициации аутоиммунных реакций, ассоциированных с СКВ. Есть

популяционные исследования, результаты которых указывают на повышенную частоту встречаемости *H. pylori* у больных системной красной волчанкой. Но есть и работы, представляющие прямо противоположные результаты (Yamanishi S. et al., 2006; Kobayashi F. et al., 2011; Ram M. et al., 2013; Surawut S. et al., 2018; Wu M-C. et al., 2020). В связи с этим был исследован уровень аутоантител против односпиральной (анти-ssДНК) и двуспиральной (анти-dsДНК) ДНК в крови больных хроническим гастритом. Было обнаружено, что медиана содержания анти-ssДНК и анти-dsДНК была вдвое ниже показателя верхней границы нормы (до 20 Ед/мл). Для лиц основной группы (с *H. pylori*-инфекцией) она составила 8,87 [7,57–12,71] и 6,34 [5,38–7,20] Ед/мл, а для лиц из группы сравнения (без *H. pylori*-инфекции) – 9,82 [7,25–15,95] и 6,73 [5,83–9,26] Ед/мл (Рисунок 8А-Б). Достоверных различий в содержании анти-ssДНК и анти-dsДНК между группами выявлено не было. Таким образом, мы получили результаты, согласно которым штаммы *H. pylori*, инфицировавшие тестируемых нами пациентов с хроническим гастритом, не вызывали повышенную продукцию аутоантител против ssДНК и dsДНК, и, как следствие, не участвовали в инициации аутоиммунных реакций, ассоциированных с системной красной волчанкой. Сравнительно недавно Youssefi M. et al. (2021), обобщив данные нескольких исследований, в которых анализировалась частота инфицирования *H. pylori* более чем у 900 больных СКВ, проживающих в разных странах, также пришли к заключению, что связи между инфицированием *H. pylori* и СКВ не существует, что согласуется с полученными нами результатами для больных хроническим гастритом.

Системная красная волчанка может быть ассоциирована с антифосфолипидным синдромом. Важным лабораторным показателем при постановке диагноза АФС является определение аутоантител против β -2-гликопротеина I. В крови больных хроническим гастритом исследовали уровень аутоантител к β -2-гликопротеину I класса IgM и IgG и обнаружили, что у всех лиц, вне зависимости от *H. pylori*-статуса уровень данных аутоантител сохранялся в пределах нормы. При этом неожиданным фактом явилось то, что уровень аутоантител против β -2-гликопротеина I классов IgM и IgG был достоверно выше у больных хроническим гастритом, не инфицированных *H. pylori*, в сравнении с инфицированными больными (Рисунок 8В-Г). Наши данные согласуются с результатами, полученными Ram M. et al. (2013), которые определяли широкий спектр аутоантител в крови больных с различными аутоиммунными заболеваниями, включая и АФС, и продемонстрировали, что уровень аутоантител к β -2-гликопротеину I класса IgG у лиц с *H. pylori*-инфекцией был достоверно ниже по сравнению с лицами, у которых эта инфекция отсутствовала. Авторы рассматривают полученные результаты как свидетельство того, что *H. pylori*-инфекция может выступать не в качестве инициатора, а в качестве защитного фактора в развитии АФС, ассоциированного с СКВ.

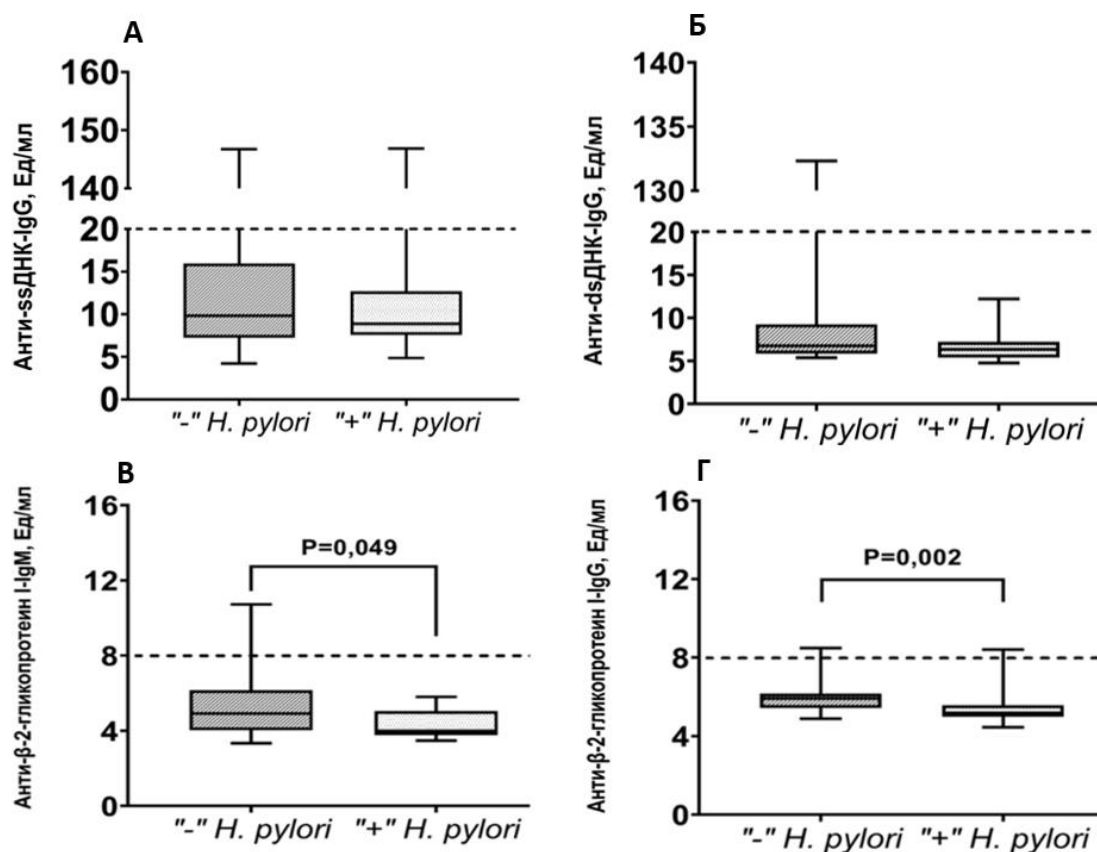


Рисунок 8 – Уровень (А) анти-ssДНК-IgG; (Б) анти-dsДНК-IgG; (В) анти-β-2-гликопротеин I-IgM; (Г) анти-β-2-гликопротеин I-IgG в крови больных хроническим гастритом

Примечание: «-» *H. pylori* – группа сравнения; «+» *H. pylori* – основная группа; ----- – граница нормы.

К аутоиммунному заболеванию, которое характеризуется хроническим воспалением синовиальной оболочки, повреждением суставного хряща и околосуставной кости относят ревматоидный артрит (РА). Причины и условия возникновения ревматоидного артрита до сих пор остаются неизвестными, а связь инфекции *H. pylori* с патогенезом РА является дискуссионной и спорной (Jones S.T. et al., 1991; Tanaka E. et al., 2005; Kobayashi F. et al., 2011; Ebrahimi A. et al., 2019; Lee T.H. et al., 2023). Одним из обязательных тестов для диагностики РА является определение ревматоидного фактора (РФ). В крови больных хроническим гастритом определяли уровень РФ и обнаружили, что у всех лиц, вне зависимости от *H. pylori*-статуса, средний уровень РФ сохранялся в пределах нормы, а достоверных различий между группами выявлено не было (*Рисунок 9*). Наши данные согласуются с результатами Shariaty Z. et al. (2015), которые также продемонстрировали, что уровень РФ у лиц с РА и *H. pylori*-инфекцией достоверно не отличался от уровня вышеуказанных аутоантител у больных ревматоидным артритом, у которых отсутствовала *H. pylori*-инфекция.

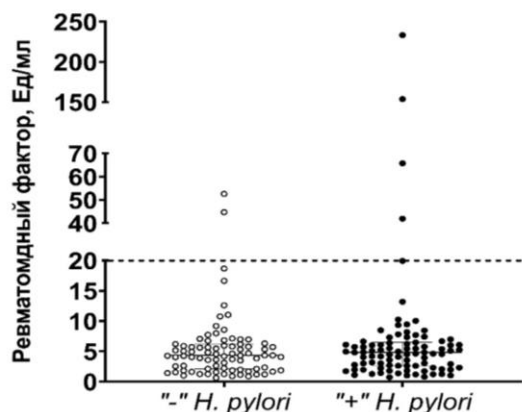


Рисунок 9 – Уровень ревматоидного фактора в крови больных хроническим гастритом

Примечание: «-» *H. pylori* – группа сравнения; «+» *H. pylori* – основная группа; ----- – граница нормы.

Существует достаточно сложная и неоднозначная картина относительно возможной связи между инфекцией *H. pylori* и аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы (Aghili R. et al., 2013; Astl J., Sterzl I., 2015; Figura N. et al., 2019). В крови больных хроническим гастритом исследовали уровень аутоантител против тиреоглобулина (анти-ТГ) и тиреопероксидазы (анти-ТПО). Было показано, что у большинства лиц с хроническим гастритом вне зависимости от *H. pylori*-статуса уровень данных аутоантител был в пределах нормы (до 100 Ед/мл для анти-ТГ и до 30 Ед/мл для анти-ТПО). Медиана содержания анти-ТГ и анти-ТПО у лиц основной группы (с *H. pylori*-инфекцией) составила 51,15 [42,41–64,12] и 18,41 [16,14–23,54] Ед/мл, а для группы сравнения (без *H. pylori*-инфекции) – 38,80 [36,53–43,18] и 16,50 [14,68–20,36] Ед/мл соответственно (Рисунок 10).

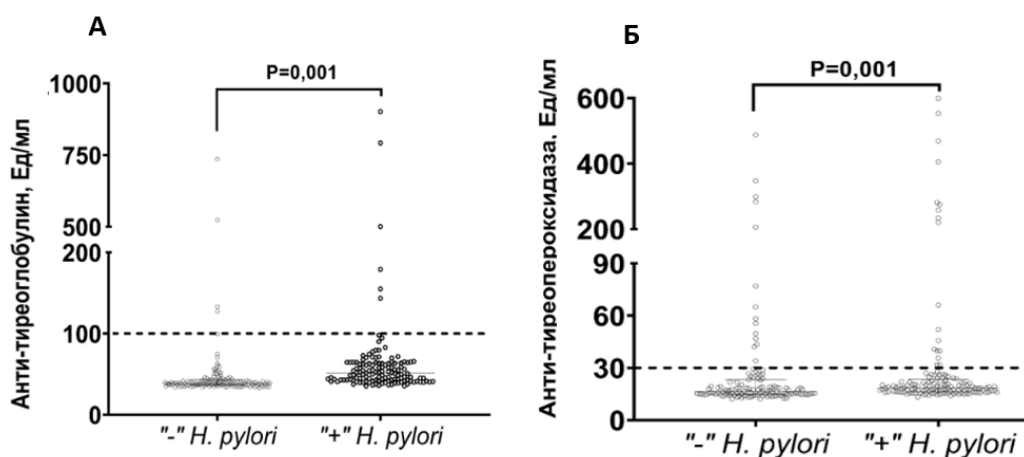


Рисунок 10 – Уровень аутоантител (А) к тиреоглобулину и (Б) к тиреопероксидазе в крови больных хроническим гастритом

Примечание: «-» *H. pylori* – группа сравнения; «+» *H. pylori* – основная группа; ----- – граница нормы.

Вполне вероятно, что как в основной группе, так и в группе сравнения есть пациенты с тиреоидитом Хашимото и повышенным уровнем соответствующих антител, однако у больных

хроническим гастритом и *H. pylori*-инфекцией маркеры аутоиммунного тиреоидита встречаются чаще, а у остальных пациентов уровень антитиреоидных аутоантител в среднем достоверно выше в сравнении с больными хроническим гастритом, у которых *H. pylori*-инфекция отсутствует. Таким образом, в отличие от аутоантител, являющихся маркерами системной красной волчанки, антифосфолипидного синдрома и ревматоидного артрита, у больных хроническим гастритом выявлены изменения в уровне аутоантител против щитовидной железы, и они, по-видимому, отражают начальные этапы инициации аутоиммунных реакций, поскольку не выходят за пределы нормы, но обладают достоверной значимостью и соответствуют литературным данным о возможной роли *H. pylori* в патогенезе аутоиммунных нарушений щитовидной железы (Figura N. et al., 1999; Shi W-J. et al., 2013; Korani M. et al., 2016; Delitala A.P. et al., 2016; Hou Y. et al., 2017).

ВЫВОДЫ

1. Совместное культивирование *H. pylori* и CD4⁺T-лимфоцитов доноров вызывает изменение их популяционного состава с поляризацией в сторону супрессорных (Treg) и провоспалительных (Th1) клеток с повышенной продукцией соответствующих цитокинов (IL-10 и IFN- γ) без проявлений возможных аутоиммунных сдвигов в сторону CD4⁺CD161⁺ (Th17) клеток.
2. В крови больных хроническим гастритом, инфицированных *H. pylori*, обнаружены более высокие уровни IL-2 и IL-23, чем в крови *H. pylori*-отрицательных пациентов при отсутствии различий в содержании CD4⁺FoxP3⁺- и CD4⁺CD161⁺-клеток, в уровне мРНК FoxP3 и мРНК IL-17A и в содержании TNF- α и мРНК TNF- α .
3. Содержание аутоантител против односпиральной и двухспиральной ДНК, бета-2-гликопротеина I класса IgM и IgG и ревматоидного фактора у больных хроническим гастритом находится в пределах нормы; при этом уровень аутоантител против бета-2-гликопротеина I классов IgM и IgG достоверно выше у больных хроническим гастритом, не инфицированных *H. pylori* в сравнении с инфицированными больными.
4. В крови инфицированных *H. pylori* больных хроническим гастритом обнаружено не выходящее за пределы нормальных значений достоверное повышение аутоантител против тиреоглобулина и тиреопероксидазы в сравнении с больными, у которых *H. pylori*-инфекция отсутствует.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

H. pylori-инфицированных пациентов с хроническим гастритом целесообразно выделять в группу риска по развитию тиреоидных аутоиммунных заболеваний.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ (по специальности 3.2.7. Иммунология) и/или индексируемых в международных базах данных WoS,

Scopus, RSCI:

1. Уровень аутоантител в крови инфицированных *H. pylori* больных хроническим гастритом / Е.В. Мохонова, В.А. Лапин, Д.А. Мелентьев, Д.В. Новиков, Н.В. Неумоина, К.М. Перфилова, М.В. Неумоина, Т.А. Трошина, И.В. Шутова, В.В. Новиков // Медицинская иммунология. – 2023. – Т. 25 (2). – С. 339-348. (IF Scopus – 0,14, Q4; RSCI; ВАК - K1).

2. Анализ состояния иммунитета у инфицированных *Helicobacter pylori* больных хроническим гастритом / Е.В. Моханова, В.А. Лапин, Д.А. Мелентьев, Д.В. Новиков, Н.В. Неумоина, К.М. Перфилова, М.В. Неумоина, Т.А. Трошина, И.В. Шутова, В.В. Новиков // Инфекция и иммунитет. – 2022. – Т.12 (2). – С. 306-314. (IF Scopus – 0,17, Q4; RSCI; BAK – K1).

3. Влияние *HELICOBACTER PYLORI* на содержание провоспалительных Т-клеточных цитокинов и продуцирующих их субпопуляций / М.И. Цыганова, М.В. Талаева, В.Ю. Талаев, Н.В. Неумоина, К.М. Перфилова, Е.В. Моханова, В.А. Лапин, Д.А. Мелентьев // Анализ риска здоровью. – 2018. – № 3. – С. 120-127. (Scopus).

4. Влияние *Helicobacter pylori* на дифференцировку Т-регуляторных клеток / А.В. Матвейчев, М.В. Талаева, В.Ю. Талаев, Н.В. Неумоина, К.М. Перфилова, Д.Г. Лапаев, Е.В. Моханова, М.И. Цыганова, В.Н. Коптелова, З.И. Никитина, В.А. Лапин, Д.А. Мелентьев // Анализ риска здоровью. – 2017. – № 1. – С. 21-28. (BAK).

Публикации в других изданиях

5. Изменение профиля экспрессии генов адаптивного ответа при *Helicobacter pylori* / Е.В. Моханова, В.А. Лапин, Д.А. Мелентьев, Д.В. Новиков, В.В. Новиков // Материалы VIII Национального конгресса бактериологов (Москва, 27–28 сентября 2023 г.). – Москва, 2023. – С. 87-88.

6. *Helicobacter pylori* и маркеры аутоиммунных заболеваний у больных хроническим гастритом / Е.В. Моханова, Н.В. Неумоина, К.М. Перфилова, Д.А. Мелентьев, В.А. Лапин, Д.В. Новиков, В.В. Новиков // Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы: сборник трудов XV Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского (Москва, 27–29 марта 2023 г.). – Москва, 2023. – С. 153-154.

7. Содержание Т-регуляторов и аутоантител к DNA в крови больных хроническим гастритом / Е.В. Моханова, В.А. Лапин, Д.А. Мелентьев, Н.В. Неумоина, К.М. Перфилова // Биосистемы: организация, поведение, управление: тезисы докладов 76-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых (Нижний Новгород, 11–14 апреля 2023 г.). – Нижний Новгород, 2023. – С. 224.

8. Связь *Helicobacter pylori*-инфекции с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы у больных хроническим гастритом в стадии обострения / Е.В. Моханова, Д.В. Новиков, В.А. Лапин, Д.А. Мелентьев, Н.В. Неумоина, К.М. Перфилова, М.В. Неумоина, Т.А. Трошина, И.В. Шутова, В.В. Новиков // Актуальные вопросы профилактической медицины и санитарно-эпидемиологического благополучия населения: факторы, технологии, управление и оценка рисков: сборник научных трудов. – Нижний Новгород, 2022. – Специальный выпуск: по материалам межрегиональной научно-практической конференции. – С. 394-398.

9. Уровень фактора некроза опухоли-альфа в крови больных хроническим гастритом, положительных по *Helicobacter pylori* / Е.В. Моханова, Д.В. Новиков, В.А. Лапин, Д.А. Мелентьев, Н.В. Неумоина, К.М. Перфилова, М.В. Неумоина, Т.А. Трошина, И.В. Шутова, В.В. Новиков // Эпидемиологический надзор за актуальными инфекциями: новые угрозы и вызовы: сборник научных трудов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию академика И.Н. Блохиной. – Нижний Новгород, 2021. – С. 386-390.

10. Лапин, В.А. Оценка влияния *Helicobacter pylori* на дифференцировку клеток иммунной системы в сторону Т-регуляторов / В.А. Лапин, Д.А. Мелентьев, Е.В. Моханова, Д.В. Новиков, Н.В. Неумоина, К.М. Перфилова, В.В. Новиков // Биосистемы: организация, поведение, управление: тезисы докладов 73-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых (Нижний Новгород, 28–30 октября 2020 г.). – Нижний Новгород, 2020. – С. 121.

11. Мелентьев, Д.А. Состояние ТН17 звена иммунитета и аутоиммунный статус у больных с гастритом // Д.А. Мелентьев, В.А. Лапин, Е.В. Моханова, Д.В. Новиков, Н.В. Неумоина, К.М. Перфилова, В.В. Новиков // Биосистемы: организация, поведение, управление: тезисы докладов 73-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых (Нижний Новгород, 28–30 октября 2020 г.). – Нижний Новгород, 2020. – С. 138.

12. Новиков, В.В. Особенности иммунного ответа человека на инфицирование *Helicobacter pylori* / В.В. Новиков, В.А. Лапин, Д.А. Мелентьев, Е.В. Моханова // Медиаль. – 2019. – № 2 (24). – С. 55-69. (ИФ РИНЦ – 0.169).

13. Оценка про- и противовоспалительной активности CD4⁺ лимфоцитов при прямом контакте с *H. pylori* / Е.В. Моханова, Д.А. Мелентьев, В.А. Лапин, М.В. Талаева, Н.В. Неумоина, К.М. Перфилова // Научное обеспечение противоэпидемической защиты населения: актуальные проблемы и решения: сборник научных трудов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора. – Нижний Новгород, 2019. – С. 237-240.

14. Влияние *Helicobacter pylori* на дифференцировку Т-клеток человека в условиях прямого контакта *in vitro* / Е.В. Моханова, В.А. Лапин, Д.А. Мелентьев, М.В. Талаева, Н.В. Неумоина, К.М. Перфилова, М.И. Цыганова // Микробиология: от микроскопа до геномного анализа: материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 95-летию кафедры микробиологии ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации (Санкт-Петербург, 17-18 мая 2018 г.). – Санкт-Петербург, 2018. – С. 141-143.

15. Влияние *Helicobacter pylori* на субпопуляцию Т-хелперных клеток человека / Д.А. Мелентьев, В.А. Лапин, Е.В. Моханова, М.В. Талаева, М.И. Цыганова // Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы: материалы X Ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням с международным участием (Москва, 26-28 февраля 2018 г.). – Москва, 2018. – С. 143.

16. Оценка влияния *Helicobacter pylori* на дифференцировку Т-reg клеток и продукцию ими IL-10 / В.А. Лапин, Д.А. Мелентьев, Е.В. Моханова, М.В. Талаева, М.И. Цыганова // Биосистемы: организация, поведение, управление: тезисы докладов 71-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых (Нижний Новгород, 17–20 апреля 2018 г.). – Нижний Новгород, 2018. – С. 130.

17. Оценка способности *Helicobacter pylori* стимулировать образование TH17 и индуцировать продукцию IFN-γ / Д.А. Мелентьев, В.А. Лапин, Е.В. Моханова, М.В. Талаева, М.И. Цыганова // Биосистемы: организация, поведение, управление: тезисы докладов 71-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых (Нижний Новгород, 17–20 апреля 2018 г.). – Нижний Новгород, 2018. – С. 152.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

Анти-dsДНК-IgG – антитела к двуспиральной ДНК

Анти-ssДНК-IgG – антитела к односпиральной ДНК

Анти-ТГ – антитела к тиреоглобулину

Анти-ТПО – антитела к тиреопероксидазе

АФС – антифосфолипидный синдром

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИФА – иммуноферментный анализ

кДНК – комплементарная ДНК

мРНК – матричная РНК

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РА – ревматоидный артрит

РНК – рибонуклеиновая кислота

РФ – ревматоидный фактор

СКВ – системная красная волчанка

CD – cluster of differentiation

Ct – threshold cycle

DDT – DL-Dithiothreitol

dNTP – deoxynucleoside triphosphate

Foxp3 – forkhead-Box Protein 3

IFN-γ – interferon-gamma

Ig – immunoglobulin

IL – interleukin

MALDI-TOF MS – Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization –Time of Flight Mass Spectrometry

MALT – Mucosa Associated Lymphoid Tissue

M-MLV – Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase

Th1 – T-helper 1

Th17 – T-helper 17

TLRs – Toll-like receptors

TNF-α – tumor necrosis factor alpha

Treg – regulatory T cells

YWHAZ – Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Zeta

МОХОНОВА
ЕКАТЕРИНА ВАЛЕРЬЕВНА

**АНАЛИЗ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ У ПАЦИЕНТОВ
С ХРОНИЧЕСКИМ ГАСТРИТОМ, ИНФИЦИРОВАННЫХ
*HELICOBACTER PYLORI***

3.2.7 – Иммунология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук