

ИНФОРМАТИВНОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИ-GP2 АНТИТЕЛ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И КОПРОФИЛЬТРАТАХ У ДЕТЕЙ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ КИШЕЧНИКА

Топтыгина А.П.^{1,3}, Семикина Е.Л.^{2,4}, Петричук С.В.², Потапов А.С.^{2,4},
Сурков А.Н.²

¹ ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

² ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

³ ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

⁴ ФГАУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Резюме. Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), такие как болезнь Крона (БК) и язвенный колит (ЯК), характеризуются хронически рецидивирующим воспалением кишечной стенки и связаны со значительным снижением качества жизни. Описан спектр генетических вариантов, ассоциированных с болезнью Крона. Пусковым фактором начала заболевания может быть дисбиоз кишечника (ДБ). Гликопротеин 2 (GP2), основной белок гранул зимогена поджелудочной железы, выделяется с пищеварительными ферментами в кишечник. Антитела против GP2 были обнаружены в крови пациентов с БК. Целью исследования было изучение уровня анти-GP2-антител в крови и фекалиях детей с ВЗК по сравнению с группой ДБ. Исследованы сыворотки крови и копрофильтраты от 110 детей (64 мальчика и 46 девочек) в возрасте 12,3 (2,6-17,9) года; 36 пациентов с БК, 30 пациентов с ЯК, группу сравнения составили 44 пациента с ДБ. Антитела IgG и IgA против GP2 тестировали методом ИФА. Применены методы непараметрической статистики, результаты представлены в процентах и медианах – Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}). Уровни сывороточных IgA-антител против GP2 составили у пациентов с БК 9,97 (3,35-13,45) Ед/мл, для ЯК 6,08 (2,71-14,26) Ед/мл и для ДБ 2,94 (2,29-6,41) Ед/мл. Уровни анти-GP2 IgG-антител в сыворотках крови составили 6,16 (3,26-18,4) Ед/мл для БК, 5,26 (2,97-7,52) Ед/мл для ЯК и для ДБ 5,23 (2,53-8,85) Ед/мл. Пороговая концентрация cut-off для анти-GP2 антител класса IgG составила 13,8 Ед/мл, чувствительность – 63,2%, специфичность – 100%, а для IgA – 5,63 Ед/мл при чувствительности 60,5% и специфичности – 78,8%, что ниже рассчитанного cut-off взрослых – 20 Ед/мл. Уровни анти-GP2 IgG в копрофильтратах составили у детей группы сравнения 1,99 (1,26-3,04) Ед/мл, у пациентов с БК – 23,5 (16,15-29,3) Ед/мл и у детей с ЯК – 20,45 (13,63-25,5) Ед/мл, (p < 0,001). Cut-off составил 8,0 Ед/мл со 100% чувствительностью и 100% специфичностью. Концентрации IgA против GP2 в копрофильтратах больных с ВЗК значимо не отличались от ДБ. При этом

Адрес для переписки:

Топтыгина Анна Павловна
ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора
125212, Россия, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10,
Тел.: 8 (495) 452-18-01.
Факс: 8 (495) 452-18-30.
E-mail: toptyginaanna@rambler.ru

Address for correspondence:

Toptygina Anna P.
G. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology
125212, Russian Federation, Moscow, Adm. Makarov str., 10.
Phone: 7 (495) 452-18-01.
Fax: 7 (495) 452-18-30.
E-mail: toptyginaanna@rambler.ru

Образец цитирования:

А.П. Топтыгина, Е.Л. Семикина, С.В. Петричук, А.С. Потапов, А.Н. Сурков «Информативность определения анти-GP2 антител в сыворотке крови и копрофильтратах у детей с воспалительными заболеваниями кишечника» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 4. С. 717-728.
doi: 10.15789/1563-0625-DVO-1998

© Топтыгина А.П. и соавт., 2020

For citation:

A.P. Toptygina, E.L. Semikina, S.V. Petrichuk, A.S. Potapov, A.N. Surkov "Diagnostic value of anti-GP2 antibodies determined in serum and coprofiltrates in children with inflammatory bowel disease", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 4, pp. 717-728.
doi: 10.15789/1563-0625-DVO-1998

DOI: 10.15789/1563-0625-DVO-1998

концентрация sIgA в копрофильтратах больных с ВЗК значимо превышала уровень группы с ДБ. Соотношение анти-GP2 IgA/sIgA было значительно ниже у пациентов с БК (0,326 (0,23-0,512)), и ЯК (0,327 (0,205-0,435)), чем у пациентов с ДБ (2,332 (1,575-3,523)) ($p < 0,001$); cut-off составил 0,784 с чувствительностью 97,7% и специфичностью 98,6%. Обсуждается, что анти-GP2 IgA антитела в фекалиях следует рассматривать как протективные, поддерживающие гомеостаз в кишечнике, а анти-GP2 IgG антитела являются патогенетически значимыми для развития ВЗК. Таким образом, используя неинвазивный метод определения анти-GP2 антител в стуле в случае превышения cut-off для IgG и снижения соотношения IgA/sIgA ниже cut-off, можно со 100% чувствительностью и 100% специфичностью дифференцировать ВЗК от ДБ, имеющего похожую клинику в начале заболевания.

Ключевые слова: GP2, антитела, болезнь Крона, язвенный колит, воспалительные заболевания кишечника

DIAGNOSTIC VALUE OF ANTI-GP2 ANTIBODIES DETERMINED IN SERUM AND COPROFILTRATES IN CHILDREN WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

Toptygina A.P.^{a, c}, Semikina E.L.^{b, d}, Petrichuk S.V.^b, Potapov A.S.^{b, d}, Surkov A.N.^b

^a G. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

^b National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

^c M. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

^d First Moscow State I. Sechenov Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Abstract. Inflammatory bowel diseases (IBD), such as Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), are characterized by chronically recurring inflammation of intestinal wall and are associated with a significant decrease in the quality of life. A spectrum of genetic variants associated with Crohn's disease is described. Intestinal dysbiosis (DB) may be the triggering factor of the disease. Glycoprotein 2 (GP2), the main protein of pancreatic zymogen granules, is secreted into the intestines with digestive enzymes. Anti-GP2 antibodies were found in the serum of patients with CD. The aim of the present study was to investigate the levels of anti-GP2 antibodies in serum and feces of children with IBD compared with the DB group. Serums and coprofiltrates from 110 children (64 boys and 46 girls) at the age of 12.3 (2.6-17.9) years were studied; 36 patients with CD, 30 patients with UC. A comparison group consisted of 44 patients with DB. IgG and IgA antibodies against GP2 were tested with ELISA. Nonparametric statistics methods are applied, the results are presented as percentages and medians (Me ($Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$)). The serum levels of anti-GP2 IgA antibodies were 9.97 (3.35-13.45) U/ml for the CD patients, 6.08 (2.71-14.26) U/ml for UC and 2.94 (2.29-6.41) U/ml for DB. The levels of anti-GP2 IgG antibodies in serum were 6.16 (3.26-18.4) U/ml for CD, 5.26 (2.97-7.52) U/ml for UC, and for DB 5.23 (2.53-8.85) U/ml. The cut-off threshold concentration for anti-GP2 IgG antibodies was 13.8 U/ml, with sensitivity of 63.2%, specificity 100%, and for IgA 5.63 U/ml, with sensitivity of 60.5% and specificity of 78.8%, thus being lower than the calculated cut-off for adults (20 U/ml). The levels of anti-GP2 IgG in coprofiltrates in children of comparison group were 1.99 (1.26-3.04) U/ml; in the patients with CD, 23.5 (16.15-29.3) U/ml, and in children with UC, 20.45 (13.63-25.5) units/ml ($p < 0.001$). The cut-off value amounted 8.0 U/ml, with 100% sensitivity and 100% specificity. Concentrations of anti-GP2 IgA in coprofiltrates of patients with IBD did not significantly differ from DB patients. Moreover, the concentration of sIgA in the coprofiltrates of patients with IBD was significantly higher than their level in DB group. The anti-GP2 IgA/sIgA ratio was significantly lower in patients with CD (0.326 (0.23-0.512)), and UC (0.327 (0.205-0.435)), than in patients with DB (2.332 (1.575-3.523)) ($p < 0.001$); the cut-off level was 0.784, with a sensitivity of 97.7% and specificity of 98.6%. It is discussed, whether fecal anti-GP2 IgA antibodies should be considered as protective, supporting intestinal homeostasis, whereas anti-GP2 IgG antibodies are pathogenetically significant for development of IBD. Thus, using a non-invasive method for determining anti-GP2 antibodies in stool, when exceeding the cut-off for IgG, and reduction of IgA/sIgA ratio below the cut-off, one may differentiate IBD from DB with a similar symptoms at the onset of disease, with 100% sensitivity and 100% specificity.

Keywords: GP2, antibody, Crohn's disease, ulcerative colitis, inflammatory bowel disease

Введение

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), такие как болезнь Крона (БК) и язвенный колит (ЯК), характеризуются хронически рецидивирующим воспалением кишечной стенки и связаны со значительным снижением качества жизни [23]. В настоящее время не существует общей этиопатогенетической модели для всех форм ВЗК. В здоровом микробиоме кишечника существует оптимальное соотношение как про-, так и противовоспалительных микроорганизмов, которые обеспечивают сигналы для развивающейся иммунной системы, контролируемой геномом хозяина, что приводит к балансу активности Treg и Th17. Состав микробиоты кишечника может являться фактором риска для развития аутоиммунных или инфекционных заболеваний, которые зависят от баланса Treg/Th17. Клетки Treg и Th17 являются мощным средством, с помощью которого слизистая оболочка может быть защищена от нежелательных воспалительных реакций на микробиоту (посредством Treg) и в то же время эффективно реагировать на микробные инфекции (Th17-лимфоцитами). Важную роль в развитии ВЗК играют особенности организма – описан спектр генетических вариантов, ассоциированных с болезнью Крона [17, 19, 26]. Пусковым фактором для начала заболевания могут быть факторы окружающей среды, например дисбиоз кишечника (ДБ) – измененный состав микробиоты [7]. В составе кишечной микрофлоры выделены «провоспалительные» и «противовоспалительные» микроорганизмы. Так, противовоспалительным действием обладает *B. fragilis*. Эффект *B. fragilis* зависит от капсульного полисахарида А (PS-A). Воздействие PS-A *in vivo* и *in vitro* является достаточным для индукции выработки Treg и цитокинов (IL-10 и TGF-β). Моноколонизация безмикробных мышей *B. fragilis* индуцирует размножение CD4 Т-клеток и увеличивает количество Treg-лимфоцитов до уровней, сходных с таковыми у традиционно выращенных мышей [18]. Кроме того, была определена роль сегментированных нитчатых бактерий (segmented filamentous bacteria – SFB) в управлении развитием клеток Th17 в *lamina propria*. Колонизация безмикробных мышей штаммом SFB приводила к увеличению числа Th17 [11]. Увеличение количества провоспалительных микроорганизмов может способствовать повышению активности клеток Th17 и, таким образом, предрасполагать генетически восприимчивых людей к Th17-опосредованному аутоиммунному заболеванию [10]. Альтернативно уменьшение

или отсутствие противовоспалительных микробов может привести к недостаточному развитию субпопуляции Treg [6, 9]. Характерные изменения в субпопуляционном составе лимфоцитов периферической крови при ВЗК определяют эффективность биологической терапии [2]. Этот дисбаланс приводит к изменению цитокинового профиля в крови пациентов, но особенно эти изменения выражены на местном уровне [3]. Микробиота человека состоит в основном из анаэробов типа *Firmicutes* и *Bacteroidetes* [4]. У пациентов с БК было обнаружено уменьшение разнообразия в типе *Firmicutes*, в частности в группе *Clostridium leptum*. Известно, что *C. leptum* продуцирует бутират, короткоцепочечную жирную кислоту, которая является источником энергии для кишечного эпителия [28]. Было также показано, что бутират подавляет провоспалительную мРНК в энтероцитах. В нескольких независимых исследованиях было показано, что количество *Bacteroidetes*, *Ruminococcaceae*, *Faecalibacterium* и *Lachnospiraceae* особенно низкое у пациентов с БК, тогда как уровень *Actinobacteria*, *Escherichia/Shigella* и *Proteobacteria* повышен по сравнению со здоровыми людьми [13, 15].

Было показано, что гликопротеин 2 (GP2), основной белок гранул зимогена поджелудочной железы, выделяется с пищеварительными ферментами в кишечник [24]. Более того, оказалось, что GP2 может связывать FimH-позитивные бактерии [14]. Антитела против GP2 были обнаружены в крови пациентов с БК [5]. Антитела против GP2 были обнаружены также в фекальных образцах пациентов с БК, но этот факт был мало изучен [30].

Целью исследования было изучение уровня анти-GP2-антител в крови и фекалиях детей с ВЗК по сравнению с группой ДБ.

Материалы и методы

Обследовано 110 детей (64 мальчика и 46 девочек) в возрасте 12,3 (2,6-17,9) года. Когорта пациентов состояла из 36 пациентов с болезнью Крона, 30 пациентов с язвенным колитом, длительность заболевания – 51 (2-169) месяц (см. табл.1), группу сравнения составили 44 пациента с дисбиозом кишечника (ДБ). Диагноз «БК» или «ЯК» установлен на основании клинических данных и комплексного обследования с учетом лабораторных, эндоскопических и гистологических критериев (критерии Леннарда–Джонса) [16]. Фенотип заболевания был определен на основе Монреальской классификации [27, 29]. У детей с ДБ диагноз был подтвержден на основании микробиологического исследования кала. Исследование

было проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией и одобрено местными этическими комитетами. От родителей пациентов было получено письменное информированное согласие.

Образцы крови были взяты с использованием системы BDVacutainer®. Антитела IgG и IgA против GP2 тестировали в образцах сыворотки и копрофильтратов с помощью коммерческого ИФА-набора (Generic Assays, Dahlewitz/Berlin, Германия) [25] в соответствии с инструкциями производителя. Для исследования использованы образцы сыворотки, взятые одновременно с проведением биохимического анализа крови. Для определения уровня антител в фекалиях готовились водно-солевые копрофильтраты: один объем фекалий смешивали с тремя объемами забуференного фосфатом солевого раствора и осаждали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 15 минут.

Для статистической обработки результатов использовали пакет статистического программного обеспечения SPSS 15.0 (SPSS Inc., США). Применены методы непараметрической статисти-

стики, результаты представлены в процентах и медианах – Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}). Значения p < 0,05 считали значимыми. Для оформления рисунков использовалось программное обеспечение Prizm (GraphPad Software Inc., США).

Результаты

Уровни сывороточных IgA и IgG антител против GP2 представлены в таблице 2. Из таблицы видно, что средние уровни анти-GP2 антител в сыворотке крови у детей с ВЗК, и особенно в группе БК, превышают средние уровни антител у детей контрольной группы с ДБ. Распределение индивидуальных значений уровней анти-GP2 IgG- и IgA-антител представлено на рисунке 1А, В.

Пороговое значение концентрации анти-GP2 антител cut-off, рассчитанное для взрослых, согласно рекомендации производителя тест-системы составляет 20 Ед/мл. Анализ результатов исследования у детей показал, что пороговые концентрации анти-GP2 антител у детей существенно отличаются от взрослых. Проведенный

ТАБЛИЦА 1. ДЕМОГРАФИЧЕСКИЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ 36 ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ КРОНА (БК) И 30 ПАЦИЕНТОВ С ЯЗВЕННЫМ КОЛИТОМ (ЯК), ВКЛЮЧЕННЫХ В НАСТОЯЩЕЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

TABLE 1. DEMOGRAPHIC AND CLINICAL CHARACTERISTICS OF THE 36 PATIENTS WITH CROHN'S DISEASE (CD) AND THE 30 PATIENTS WITH ULCERATIVE COLITIS (UC) INCLUDED IN THE PRESENT STUDY

Количество пациентов (n) Number of patients (n)	БК CD	ЯК UC
	36	30
Пол (м/ж) Sex (m/f)	24 (66,7%)/12 (33,3%)	19 (63,3%)/11 (36,7%)
Возраст (M±SD) годы Age (mean±SD) years	12,9±3,8	11,6±4,8
Длительность заболевания (M±SD), месяцы Disease duration (mean±SD), month	46,0±37,1	57,0±48,9
Расположение, n (%) Location, n (%)	L1: 7 (19,4%)	E1: 5 (16,7%)
	L2: 12 (33,3%)	E2: 4 (13,3%)
	L3: 17 (47,3%)	E3: 21 (70%)
Прогрессирование, n (%) Behaviour, n (%)	B1: 23 (63,9%)	
	B2: 5 (13,9%)	
	B3: 2 (5,5%)	
	P: 6 (16,7%)	
Возраст постановки диагноза, n (%) Diagnosis age, n (%)	A1: 36 (100%)	
	A2: 0 (0%)	
	A3: 0 (0%)	

Примечание. Фенотип заболевания определен на основе Монреальской классификации [27, 29].

Note. The phenotype of the disease is determined based on the Montreal classification [27, 29].

ТАБЛИЦА 2. УРОВНИ АНТИ-GP2 КЛАССОВ IgA И IgG АНТИТЕЛ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ (Ед/мл), Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. LEVELS OF THE ANTI-GP2 ANTIBODY OF IgG AND IgA CLASSES IN SERUM (U/ml), Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Антитела Antibody	БК CD	ЯК UC	ДБ DB
GP2 IgG	6,16 (3,26-18,4)	5,26 (2,97-7,52)	5,23 (2,53-8,85)
GP2 IgA	9,97 (3,35-13,45)	6,08 (2,71-14,26)	2,94 (2,29-6,41)

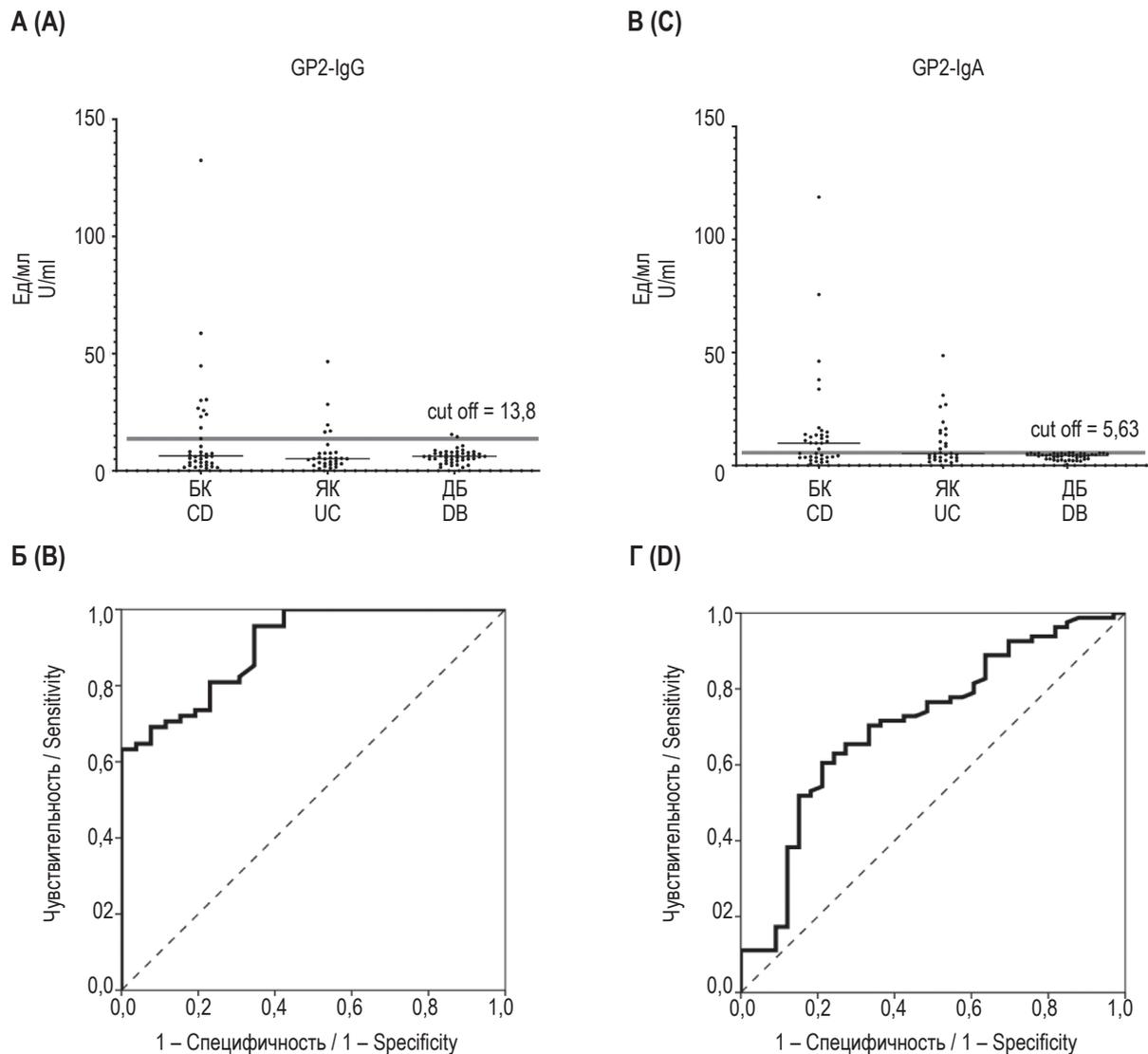


Рисунок 1. Результаты исследования уровней анти-GP2 антител классов G и A в сыворотке крови обследованных детей

Примечание. А – уровни анти-GP2 IgG-антител в сыворотке крови обследованных детей. Медианы по группам обозначены черными линиями. Уровень cut-off обозначен серой линией. Б – ROC-анализ уровней анти-GP2 IgG-антител в сыворотке крови обследованных детей. В – уровни анти-GP2 IgA-антител в сыворотке крови обследованных детей. Медианы по группам обозначены черными линиями. Уровень cut-off обозначен серой линией. Г – ROC-анализ уровней анти-GP2 IgA-антител в сыворотке крови обследованных детей.

Figure 1. Results of the anti-GP2 antibody of G and A classes levels study in the serum of the examined children

A, levels of anti-GP2 IgG antibodies in the serum of the examined children. Group medians are indicated by black lines. The cut-off level is indicated by a gray line. B, ROC-analysis of anti-GP2 IgG antibody levels in the serum of the examined children. C, levels of anti-GP2 IgA antibodies in the serum of the examined children. Group medians are indicated by black lines. The cut-off level is indicated by a gray line. D, ROC-analysis of anti-GP2 IgA antibody levels in the serum of the examined children.

ТАБЛИЦА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ROC-АНАЛИЗА УРОВНЕЙ АНТИ-GP2 АНТИТЕЛ КЛАССОВ IgA И IgG В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

TABLE 3. RESULTS OF THE ROC-ANALYSIS OF THE ANTI-GP2 ANTIBODY OF IgG AND IgA CLASSES LEVELS IN SERUM

Антитела Antibody	Площадь под кривой Area under the curve	Стандартная ошибка Standard error	95% доверительные интервалы 95% confidence interval		Чувствительность Sensitivity	Специфичность Specificity	Пороговый критерий Cut-off
			Нижний Lower	Верхний Upper			
GP2 IgG	0,904	0,032	0,842	0,966	63,2%	100%	13,8
GP2 IgA	0,710	0,054	0,603	0,816	60,5%	78,8%	5,63

ТАБЛИЦА 4. УРОВНИ АНТИ-GP2 КЛАССОВ IgA И IgG АНТИТЕЛ В КОПРОФИЛЬТРАТАХ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 4. LEVELS OF THE ANTI-GP2 ANTIBODY OF IgG AND IgA CLASSES IN THE COPROFILTRATES, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Антитела Antibody	БК CD	ЯК UC	ДБ DB
GP2 IgG (Ед/мл) GP2 IgG (U/ml)	23,5 (16,15-29,3)	20,45 (13,63-25,5)	1,99 (1,26-3,04)
GP2 IgA (Ед/мл) GP2 IgA (U/ml)	280,9 (107,35-617,08)	215,8 (103,15-375,93)	305,2 (110-66,25)
slgA (мкг/мл) slgA (µg/ml)	1104,6 (431,73-1714,3)	821,8 (377,15-1736,2)	162,09 (50,09-261,65)
GP2IgA/slga	0,326 (0,23-0,512)	0,327 (0,205-0,435)	2,332 (1,575-3,523)

ТАБЛИЦА 5. РЕЗУЛЬТАТЫ ROC-АНАЛИЗА УРОВНЕЙ АНТИ-GP2 АНТИТЕЛ В КОПРОФИЛЬТРАТАХ

TABLE 5. RESULTS OF THE ROC-ANALYSIS OF THE ANTI-GP2 ANTIBODY IN THE COPROFILTRATES

Антитела в стуле Antibody in feces	Площадь под кривой Area under the curve	Стандартная ошибка Standard error	95% доверительные интервалы 95% confidence interval		Чувствительность Sensitivity	Специфичность Specificity	Пороговый критерий Cut-off
			Нижний Lower	Верхний Upper			
GP2 IgG	0,997	0,003	0,991	1,003	100%	100%	8,0
GP2 IgA/slga	0,998	0,002	0,993	1,002	97,7%	98,6%	0,784

ROC-анализ показал большую диагностическую ценность для анти-GP2 антител класса IgG (рис. 1Б) – пороговая концентрация cut-off для детей с ВЗК по сравнению с контрольной группой составила 13,8 Ед/мл, при этом чувствительность составила 63,2% при 100% специфичности. При определении антител IgA против GP2 у пациентов с ВЗК по сравнению с группой детей без ВЗК оптимальное соотношение чувствительности и специфичности получено при концентрации антител 5,63 Ед/мл (рис. 1Г). Чувствитель-

ность составила 60,5%, специфичность – 78,8% (табл. 3).

Как и у взрослых пациентов [20], анти-GP2-антитела в сыворотке крови были выявлены не у всех детей с ВЗК. Среди 36 пациентов с БК только у 10 (27,7%) антитела против GP2 превышали рассчитанный cut-off для IgG, а 20 (55,4%) имели антитела, превышающие рассчитанный cut-off для IgA. У пяти (16,6%) из 30 пациентов с ЯК концентрация анти-GP2 IgG превышала cut-off, и у 13 (43,3%) уровень IgA-антител против GP2 превышал cut-off. Ни у одного из 44 детей кон-

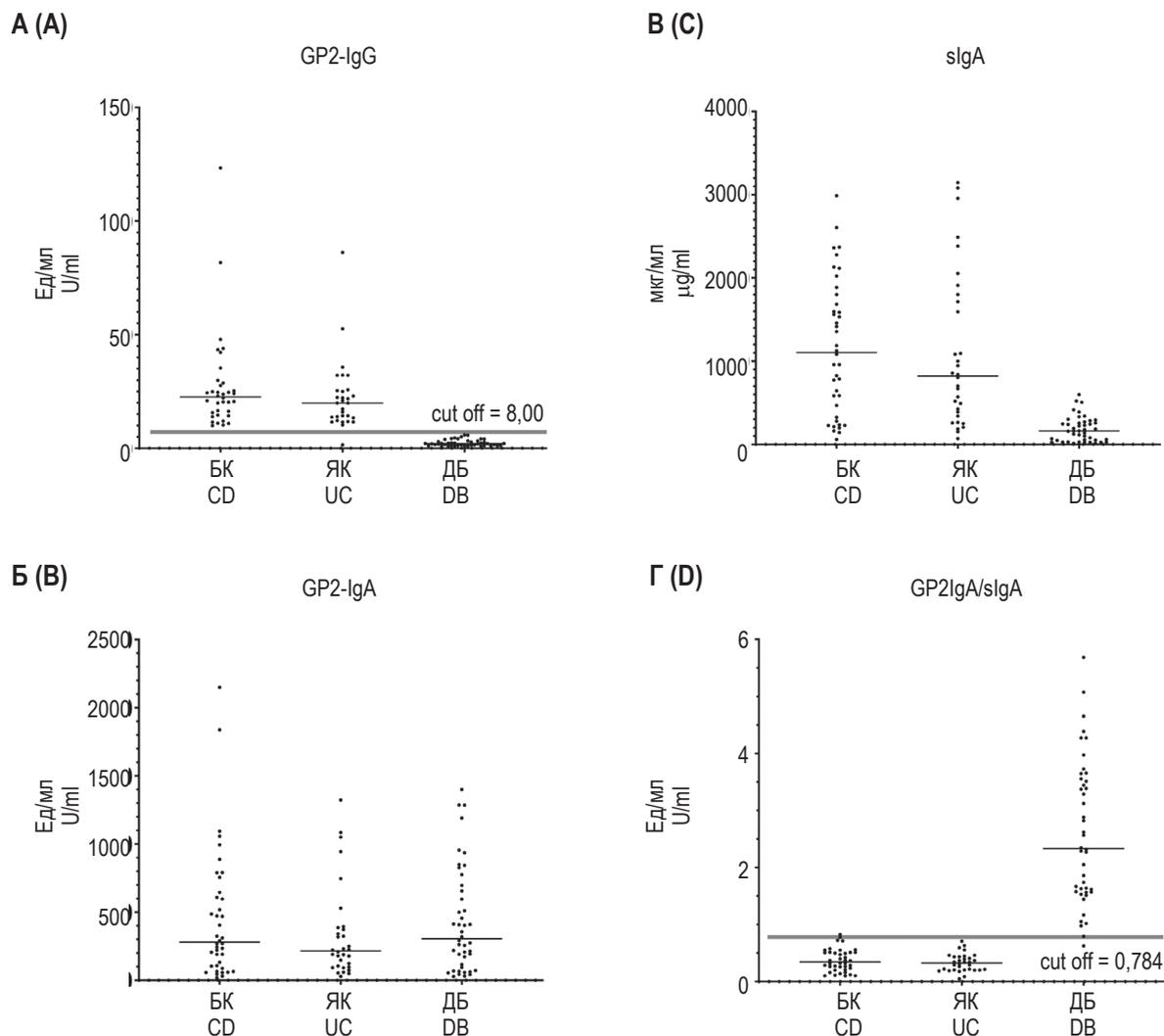


Рисунок 2. Результаты исследования уровней анти-GP2 антител классов G и A в копрофильтратах обследованных детей

Примечание. А – уровни анти-GP2 IgG-антител в копрофильтратах обследованных детей. Медианы по группам обозначены черными линиями. Уровень cut-off обозначен серой линией. Б – уровни анти-GP2 IgA-антител в копрофильтратах обследованных детей. Медианы по группам обозначены черными линиями. В – уровни секреторных IgA (slgA) в копрофильтратах обследованных детей. Медианы по группам обозначены черными линиями. Г – соотношение анти-GP2 IgA/slglA в копрофильтратах обследованных детей. Медианы по группам обозначены черными линиями. Уровень cut-off обозначен серой линией.

Figure 2. Results of the anti-GP2 antibody of G and A classes levels study in the coprofiltrates of the examined children

A, levels of anti-GP2 IgG antibodies in the coprofiltrates of the examined children. Group medians are indicated by black lines. The cut-off level is indicated by a gray line. B, levels of anti-GP2 IgA-antibodies in the coprofiltrates of the examined children. Group medians are indicated by black lines. C, levels of secretory IgA (slgA) in the coprofiltrates of the examined children. Group medians are indicated by black lines. D, ratio of anti-GP2 IgA/slglA in coprofiltrates of examined children. Group medians are indicated by black lines. The cut-off level is indicated by a gray line.

трольной группы с ДБ не выявлено анти-GP2 IgA, и только у 1 (3,3%) уровень анти-GP2 IgG превысил cut-off (15,5 Ед/мл). Уровень IgA-антител против GP2 в сыворотке пациентов с БК был значительно выше по сравнению с пациентами с ЯК ($p = 0,034$) и контрольной группой ($p = 0,0028$).

Уровни антител против GP2 в копрофильтратах у детей представлены в таблице 4. Из таблицы видно, что в копрофильтратах количество анти-

GP2 IgG антител у детей с ВЗК значительно превышают аналогичный уровень группы сравнения ($p < 0,001$) (рис. 2А). Cut-off, рассчитанный для IgG против GP2 в кале, составил 8,0 Ед/мл со 100% чувствительностью и 100% специфичностью (табл. 5).

Концентрации IgA против GP2 в копрофильтратах как для больных с БК, так и для больных с ЯК значительно не отличались от показателей кон-

трольной группы с ДБ (см. табл. 4 и рис. 2Б). Следует отметить, что IgA в кале присутствуют в виде секреторной формы sIgA. Исследование уровней sIgA в копрофильтрах выявило значимое превышение ($p < 0,001$) этого показателя у больных с ВЗК по сравнению с контрольной группой (см. табл. 4 и рис. 2В), что вполне объяснимо тяжелым воспалительным процессом у больных ВЗК. С учетом более высокого уровня анти-GP2 sIgA у пациентов с ВЗК было исследовано соотношение анти-GP2 IgA/sIgA. Оказалось, что соотношение анти-GP2 IgA/sIgA было значительно ниже у пациентов с БК и ЯК ($p < 0,001$), чем у пациентов с ДБ (см. табл. 4 и рис. 2Г). Рассчитанный cut-off составил 0,784 с чувствительностью 97,7% и специфичностью 98,6% (см. табл. 5).

Обсуждение

В результате проведенной работы удалось показать, что в крови детей с ВЗК имеются анти-GP2 антитела классов IgG и IgA, а в крови детей с ДБ таких антител не обнаруживается. Так же как и у взрослых пациентов, эти антитела обнаруживают не у всех пациентов, но у пациентов с БК чаще, чем с ЯК [8, 21, 22]. В отличие от взрослых, концентрации анти-GP2 антител у детей ниже и рассчитанные нами значения cut-off для детей также оказались ниже, чем у взрослых. Такие результаты вполне понятны, поскольку у детей иммунная система находится еще в процессе становления. Диагностическое значение для ВЗК имеет сывороточная концентрация анти-GP2 антител класса IgG, для которых площадь под кривой составила 0,904. Данный показатель имел 100% специфичность при чувствительности 63,2%. По-видимому, это связано с небольшим процентом детей с ВЗК, имеющих сывороточные анти-GP2-антитела.

Более интересные результаты были получены при исследовании анти-GP2 антител в фекалиях. Анти-GP2 IgA антитела были обнаружены у всех обследованных детей независимо от диагноза. Их количество в десятки и сотни раз выше, чем в крови, что в целом согласуется с имеющимися данными о физиологической секреции белка GP2. Несмотря на то, что GP2 белок открыт уже довольно давно, не вполне понятна его функция. Этот белок синтезируется в большом количестве в поджелудочной железе и выделяется вместе с пищеварительными ферментами при каждом поступлении пищи. Вопреки ожиданиям, GP2 белок не участвует в пищеварении [24]. Показано, что GP2 белок способен связываться с грам-бактериями, несущими фимбрию 1 типа [14]. Известно, что одной из функций sIgA является по-

мощь бактериям комменсалам в формировании биопленок. Это препятствует вымыванию благоприятной флоры из кишечника и создает условия для ее выживания и размножения [1]. Показано, что sIgA кишечника направлены к грам⁺ бактериям [20]. Мы считаем, что грам⁻ бактерии используют немного другой механизм: они связывают GP2 белок, а его, в свою очередь, связывают анти-GP2 sIgA антитела. Это позволяет различным видам грам⁻ бактерий, с одной стороны, образовывать единую биопленку, что дает преимущества для выживания, поскольку формируются пищевые цепочки разных бактерий, где метаболиты одних бактерий являются субстратом для других. С другой стороны, такой механизм взаимодействия антител с бактериями через GP2 препятствует повреждению бактерий антителами. Мы считаем, что анти-GP2 sIgA антитела в фекалиях являются протективными, способствуют выживанию грам⁻ комменсалов, поддерживая таким образом гомеостаз в кишечнике.

Уровень фекальных анти-GP2 IgA антител в нашем исследовании не показал достоверных различий от группы сравнения, хотя можно отметить тенденцию к снижению этого показателя у больных ВЗК. Эта тенденция к снижению вызывает большой интерес с учетом того, что общий уровень IgA в фекалиях у детей с ВЗК значительно выше группы сравнения. При этом особенно информативным представляется анализ соотношения анти-GP2 IgA к общему уровню секреторных IgA. Соотношение GP2-IgA/sIgA у пациентов с ВЗК оказалось значимо ниже, чем у детей группы сравнения: площадь под кривой составила 0,998 при чувствительности 97,7% и специфичности 98,6%, что характеризует высокую диагностическую значимость полученного нами порогового значения 0,784.

Известен еще один сайт синтеза GP2 белка — это М-клетки [14]. В данном случае GP2 является мембранным рецептором М-клеток, позволяющим связывать грам⁻ бактерии, несущие фимбрию 1-го типа. М-клетка использует GP2 для проведения таких бактерий в свой «карман» и дальнейшего предоставления их дендритным клеткам. Мы считаем, что уровень анти-GP2 IgG антител в фекалиях является патогенетически значимым для развития ВЗК. С учетом имеющихся данных, что повреждение именно М-клетки является тем первым очагом воспаления, с которого начинается ВЗК [12], можно предположить, что наличие анти-GP2 IgG-антител в просвете кишечника будет приводить к фиксации этих антител на М-клетках и к повреждению их с помощью одного из антителозависимых иммунологических

механизмов. Содержание анти-GP2 IgG антител в копрофильтрах у детей с ВЗК оказалось существенно выше, чем у детей группы сравнения. Более того, в отличие от довольно редких случаев обнаружения анти-GP2 IgG антител в сыворотке крови, анти-GP2 IgG антитела в копрофильтрах обнаруживались у 65 детей из 66 больных ВЗК и значительно превышали уровень соответствующих антител у детей из группы с ДБ, который практически не отличался от нуля. По-видимому, в здоровом организме нет анти-GP2 IgG антител. Образование анти-GP2 IgG антител ассоциировано с формированием очага воспаления в кишечной стенке. Далее образуется петля положительной обратной связи: чем больше уровень анти-GP2 IgG антител в кишечнике, тем больше они повреждают М-клетки и провоцируют воспаление кишечной стенки, а чем выше воспаление и нарушение целостности эпителиального барьера кишечника, тем больше анти-GP2 IgG антител оказывается в кишечном содержимом. Концентрация анти-GP2 IgG антител в копрофильтрах показала высокую диагностическую ценность: площадь под кривой составила 0,997 при 100% чувствительности и специфичности!

В результате нашей работы были рассчитаны cut-off для анти-GP2 антител классов IgA и IgG в

крови больных детей. Исследованы уровни анти-GP2 антител классов IgA и IgG в фекалиях детей с ВЗК, рассчитаны cut-off для анти-GP2 антител IgG в фекалиях и для соотношения GP2-IgA/sIgA антител в фекалиях, что позволяет со 100% чувствительностью и 100% специфичностью дифференцировать ВЗК от ДБ, имеющего похожую клинику в начале заболевания. Особенно важно, что предложенный метод является неинвазивным и не доставляет пациенту никаких неудобств, в отличие от классической эндоскопии с биопсией. Кроме того, мы предложили новую концепцию о роли анти-GP2 антител классов IgA и IgG в фекалиях. Было обнаружено повышение уровней анти-GP2 IgG антител и снижение анти-GP2 IgA антител, особенно соотношения GP2-IgA/sIgA. По нашему мнению, такие противоположно направленные соотношения анти-GP2 антител классов IgA и IgG в фекалиях связаны с разной ролью этих антител в патогенезе ВЗК. Анти-GP2 антитела класса IgA в фекалиях следует рассматривать как протективные, поддерживающие гомеостаз в кишечнике, а анти-GP2 антитела класса IgG являются патогенетически значимыми для развития ВЗК.

Список литературы / References

1. Климович В.Б. Защитные и гомеостатические функции секреторных иммуноглобулинов (SIG) // Российский иммунологический журнал, 2008. Т. 2 (11), № 2. С. 2-7. [Klimovich V.B. Protective and homeostatic functions of secretory immunoglobulins (SIG). *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2008, Vol. 2 (11), no. 2, pp. 2-7. (In Russ.)]
2. Петричук С.В., Мирошкина Л.В., Семикина Е.Л., Топтыгина А.П., Потапов А.С., Цимбалова Е.Г., Радыгина Т.В. Показатели популяционного состава лимфоцитов как предикторы эффективности терапии ингибитором TNF- α у детей с воспалительными заболеваниями кишечника // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 5. С. 721-730. [Petrichuk S.V., Miroshkina L.V., Semikina E.L., Toptygina A.P., Potapov A.S., Tsimbalova E.G., Radygina T.V. Indicators of the lymphocyte subsets as efficiency predictors of therapy with inhibitors of TNF α in children with inflammatory bowel disease. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 5, pp. 721-730. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-721-730.
3. Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Бобылева Г.В., Мирошкина Л.В., Петричук С.В. Цитокиновый профиль у детей с воспалительными заболеваниями кишечника // Биохимия, 2014. Т. 79, № 12. С. 1673-1679. [Toptygina A.P., Bobyleva G.V., Semikina E.L., Miroshkina L.V., Petrichuk S.V. Cytokine profile in children with inflammatory bowel disease. *Biokhimiya = Biochemistry*, 2014, Vol. 79, no. 12, pp. 1371-1375. (In Russ.)]
4. Arumugam M., Raes J., Pelletier E., le Paslier D., Yamada T., Mende D.R., et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 2011, Vol. 473, pp. 174-180.
5. Bogdanos D.P., Rigopoulou E.I., Smyk D.S., Roggenbuck D., Reinhold D., Forbes A., Laass M.W., Conrad K. Diagnostic value, clinical utility and pathogenic significance of reactivity to the molecular targets of Crohn's disease specific-pancreatic autoantibodies. *Autoimmun. Rev.*, 2011, Vol. 11, pp. 143-148.
6. Chao K., Zhang S., Yao J., He Y., Chen B., Zeng Z., Zhong B., Chen M. Imbalances of CD4(+) T-cell subgroups in Crohn's disease and their relationship with disease activity and prognosis. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2014, Vol. 29, pp. 1808-1814.
7. Cobrin G.M., Abreu M.T. Defects in mucosal immunity leading to Crohn's disease. *Immunol. Rev.*, 2005, Vol. 206, pp. 277-295.

8. de Beéck K.O., Vermeire S., Rutgeerts P., Bossuyt X. Antibodies to GP2, the major zymogen granule membrane glycoprotein, in inflammatory bowel diseases. *Gut*, 2012, Vol. 61, pp. 162-164.
9. Fonseca-Camarillo G., Yamamoto-Furusho J.K. Immunoregulatory pathways involved in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2015, Vol. 21, no. 9, pp. 2188-2193.
10. Fujino S., Andoh A., Bamba S., Ogawa A., Hata K., Araki Y., Bamba T., Fujiyama Y. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut*, 2003, Vol. 52, pp. 65-70.
11. Gaboriau-Routhiau V., Rakotobe S., Lecuyer E., Mulder, I., Lan A., Bridonneau C., Rochet V., Pisi A., de Paepe M., Brandi G., Eberl G., Snel J., Kelly D., Cerf-Bensussan N. The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity*, 2009, Vol. 31, no. 4, pp. 677-689.
12. Gullberg E., Söderholm J.D. Peyer's patches and M cells as potential sites of the inflammatory onset in Crohn's disease. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2006, Vol. 1072, pp. 218-232.
13. Hansen R., Russell R.K., Reiff C., Louis P., McIntosh F., Berry S.H., Mukhopadhyia I., Bisset W.M., Barclay A.R., Bishop J., Flynn D.M., McGrogan P., Loganathan S., Mahdi G., Flint H.J., El-Omar E.M., Hold G.L. Microbiota of de-novo pediatric IBD: increased *Faecalibacterium prausnitzii* and reduced bacterial diversity in Crohn's but not in ulcerative colitis. *Am. J. Gastroenterol.*, 2012, Vol. 107, pp. 1913-1922.
14. Hase K., Kawano K., Nochi T., Pontes G.S., Fukuda S., Ebisawa M., Kadokura K., Tobe T., Fujimura Y., Kawano S., Yabashi A., Waguri S., Nakato G., Kimura S., Murakami T., Iimura M., Hamura K., Fukuoka S., Lowe A.W., Itoh K., Kiyono H., Ohno H. Uptake through glycoprotein 2 of FimH⁺ bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature*, 2009, Vol. 462, no. 7270, pp. 226-230.
15. Hold G.L., Smith M., Grange C., Watt E.R., El-Omar E.M., Mukhopadhyia I. Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: What have we learnt in the past 10 years? *World J. Gastroenterol.*, 2014, Vol. 20, no. 5, pp. 1192-1210.
16. Lennard-Jones J.E. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol., Suppl.*, 1989, Vol. 170, pp. 2-6.
17. Liu J.Z., van Sommeren S., Huang H., Ng S.C., Alberts R., Takahashi A., Ripke S., Lee J.C., Jostins L., Shah T., Abedian S., Cheon J.H., Cho J., Dayani N.E., Franke L., Fuyuno Y., Hart A., Juyal R.C., Juyal G., Kim W.H., Morris A.P., Poustchi H., Newman W.G., Midha V., Orchard T.R., Vahedi H., Sood A., Sung J.Y., Malekzadeh R., Westra H.J., Yamazaki K., Yang S.K.; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium; International IBD Genetics Consortium, Barrett J.C., Alizadeh B.Z., Parkes M., Bk T., Daly M.J., Kubo M., Anderson C.A., Weersma R.K. Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nat. Genet.*, 2015, Vol. 47, no. 9, pp. 979-986.
18. Mazmanian S.K., Round J.L., Kasper D.L. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature*, 2008, Vol. 453, pp. 620-625.
19. McGovern D., Kugathasan S., Cho J.H. Genetics of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 2015, Vol. 149, no. 5, pp. 1163-1176.
20. Palm N.W., De Zoete M.R., Cullen T.W., Barry N.A., Stefanowski J., Hao L., Degnan P.H., Hu J., Peter I., Zhang W., Ruggiero E., Cho J.H., Goodman A.L., Flavell R.A. Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease. *Cell*, 2014, Vol. 158, pp. 1000-1010.
21. Pavlidis P., Forbes A., Bogdanos D.P. Antibodies to glycoprotein 2 (GP2) in patients with inflammatory bowel diseases from UK. *Clin. Chim. Acta*, 2011, Vol. 412, no. 11-12, pp. 1163-1164.
22. Pavlidis P., Romanidou O., Roggenbuck D., Mytilinaiou M.G., Al-Sulttan F., Liaskos C., Smyk D.S., Koutsoumpas A.L., Rigopoulou E.I., Conrad K., Forbes A., Bogdanos D.P. Ileal inflammation may trigger the development of GP2-specific pancreatic autoantibodies in patients with crohn's disease. *Clin. Dev. Immunol.*, 2012, Vol. 2012, 640835. doi: 10.1155/2012/640835.
23. Podolsky DK. The current future understanding of inflammatory bowel disease. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 2002, Vol. 16, pp. 933-943.
24. Roggenbuck D., Hausdorf G., Martinez-Gamboa L., Reinhold D., Büttner T., Jungblut P.R., Porstmann T., Laass M.W., Henker J., Büning C., Feist E., Conrad K. Identification of GP2, the major zymogen granule membrane glycoprotein, as the autoantigen of pancreatic antibodies in Crohn's disease. *Gut*, 2009, Vol. 58, no. 12, pp. 1620-1628.
25. Roggenbuck D., Reinhold D., Wex T., Goihl A., von Arnim U., Malferteiner P., Büttner T., Porstmann T., Porstmann S., Liedvogel B., Bogdanos D.P., Laass M.W., Conrad K. Autoantibodies to GP2, the major zymogen granule membrane glycoprotein, are new markers in Crohn's disease. *Clin. Chim. Acta*, 2011, Vol. 412, no. 9-10, pp. 718-724.
26. Russell R. K., Drummond H. E., Nimmo E. E. Anderson N., Smith L., Wilson D.C., Gillett P.M., McGrogan P., Hassan K., Weaver L.T., Bisset M., Mahdi G., Satsangi J. Genotype-phenotype analysis in childhood-onset Crohn's disease: NOD2/CARD15 variants consistently predict phenotypic characteristics of severe disease. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2005, Vol. 11, pp. 955-964.
27. Satsangi J., Silverberg M. S., Vermeire S., Colombel J.-F. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut*, 2006, Vol. 55, no. 6, pp. 749-753.

28. Sha S., Xu B., Wang X., Zhang Y., Wang H., Kong X., Zhu H., Wu K. The biodiversity and composition of the dominant fecal microbiota in patients with inflammatory bowel disease. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2013, Vol. 75, pp. 245-251.
29. Silverberg M.S., Satsangi J., Ahmad T., Arnott I.D., Bernstein C.N., Brant S.R., Caprilli R., Colombel J.F., Gasche C., Geboes K., Jewell D.P., Karban A., Loftus E.V. Jr, Peña A.S., Riddell R.H., Sachar D.B., Schreiber S., Steinhart A.H., Targan S.R., Vermeire S., Warren B.F. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Canad. J. Gastroenterol.*, 2005, Vol. 19, Suppl. A, pp. 5A-36A.
30. Werner L., Sturm A., Roggenbuck D., Yahav L., Zion T., Meirowitz E., Ofer A., Guzner-Gur H., Tulchinsky H., Dotan I. Antibodies against glycoprotein 2 are novel markers of intestinal inflammation in patients with an ileal pouch. *J. Crohn's Colitis*, 2013, Vol. 7, no. 11, pp. e522-e532.

Авторы:

Топтыгина А.П. — д.м.н., руководитель лаборатории цитокинов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора; профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Семикина Е.Л. — д.м.н., заведующая централизованной клинико-диагностической лабораторией ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ; профессор кафедры педиатрии и детской ревматологии ФГАУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Петричук С.В. — д.б.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Topotygina A.P., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Cytokines, G. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology; Professor, Department of Immunology, M. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Semikina E.L., PhD, MD (Medicine), Head, Central Diagnostic Laboratory, National Medical Research Center of Children's Health; Professor, Department of Pediatrics and Pediatric Rheumatology, First Moscow State I. Sechenov Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Petrichuk S.V., PhD, MD (Biology), Professor, Main Research Associate, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Потапов А.С. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории разработки новых технологий и лечения болезней детского возраста ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ; профессор кафедры педиатрии и детской ревматологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Potapov A.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Main Research Associate, Laboratory for Development of New Technologies for Diagnostics and Treatment of Childhood Diseases, National Medical Research Center of Children's Health; Professor, Department of Pediatrics and Pediatric Rheumatology, First Moscow State I. Sechenov Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Сурков А.Н. — д.м.н., заведующий гастроэнтерологическим отделением с гепатологической группой ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Surkov A.N., PhD, MD (Medicine), Head, Department of Gastroenterology with Hepatology Group, National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Поступила 06.04.2020
Отправлена на доработку 30.04.2020
Принята к печати 06.05.2020

Received 06.04.2020
Revision received 30.04.2020
Accepted 06.05.2020