

СЕРОЛОГІЧНІ МАРКЕРИ *H.pylori* ТА ГЕРПЕСВІРУСІВ У ХВОРИХ НА РАК ШЛУНКУ

Чернявський В.І., Бірюкова С.В., Смелянська М.В., Перемот С.Д., Біляєвська С.Ю.,
Мартинов А.В., Крестецька С.Л.

Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова АМН України

Відомо, що гуморальна імунна відповідь організму є інтегральним результатом цілого ряду клітинних та молекулярних взаємодій, що відбуваються в певній послідовності. Результатом цих процесів є активація В-лімфоцитів, їх проліферація і диференціація в клітини, які продукують антитіла, а роль специфічних Ig в захисті від бактеріальних та вірусних інфекцій добре відома. Виходячи з даних літератури і власних спостережень ми вважали за доцільне вивчити рівень серопозитивності до антигенів *H.pylori* (HP) та герпесвірусів у обстежуваних осіб. При цьому ми виходили з того, що тривала персистенція цих патогенів приводить до індукції специфічних антитіл, які можуть бути виявлені з діагностичною метою та використані в якості додаткового критерію при формуванні груп підвищеного ризику виникнення неопластичних уражень шлунку.

Матеріали та методи дослідження

Всі хворі ($n=120$), які були оперовані з приводу раку шлунку були розділені на 2-і репрезентативні групи: 1-а ($n=39$) в тканині пухлини шлунку HP був виявлений в 66 % випадків; 2-а ($n=48$) в тканині пухлин шлунку яких HP був виявлений в 74 % випадків одночасно з представниками родини *Herpesviridae*. В якості контролю (3-я, $n=33$) використовували сироватку крові практично здорових осіб, співставних за віком і статтю з основними групами.

Визначення серологічних маркерів HP в сироватці крові проводили за допомогою імуноферментної тест-системи (Хелико Бест-антитела) основою якої є рекомбінантні антигени HP. Виявляли специфічні Ig класів M, A, G. Вихідним матеріалом слугували цільні сироватки, а в подальшому при титруванні використовували 2-кратне їх розведення. Тестування сироваток крові проводили методом непрямой імунофлуоресценції з використанням діагностичних імуноферментних систем. Для виявлення Ig класу G до HSV – „Вектор ВІГ-Ig G”, Ig класу G до HCMV – „Вектор ЦМВ-Ig G” та Ig класу G до EBV – „Вектор ВСБ-NA-Ig G”. Достовірність розбіжностей між групами, які порівнювали, обчислювали за допомогою t-критерію Стьюдента-Фішера.

Результати та їх обговорення

Результати дослідження наведені в малюнку. Отримані дані свідчать, що середні титри специфічних антихелікобактерних антитіл в 1-й та 2-й групах обстежуваних пацієнтів були достовірно вищими в порівнянні з аналогічними показниками в контрольній групі (3-я) і склали відповідно $98,4 \pm 8,7$, $116,2 \pm 9,4$ та $27,5 \pm 2,1$. При цьому, слід звернути увагу на наступне: у відповідності з рекомендаціями до тест-системи, яку ми використовували, результати вважаються сумнівними при титрах 1:10 і позитивними при титрах 1:20 і вище. У зв'язку з цим ми проаналізували індивідуальні показники рівнів специфічних антитіл у осіб, які входили в групи, що порівнювалися. При цьому виявилось, що у 23 % пацієнтів 1-ї групи титр антитіл складав 1:10, а у 77 % був від 1:20 до 1:320. У пацієнтів 2-ї групи титр 1:10 був у 17,1 %, а у 82,9 % вище ніж 1:40. В той же час в сироватках крові здорових осіб титр антитіл рееструвався у 42,8 % і лише у 57,2 % був 1:20 – 1:80, причому серопозитивні результати в цій групі гееструвалися в 2 і більше разів рідше, ніж в основних групах, які порівнювали.

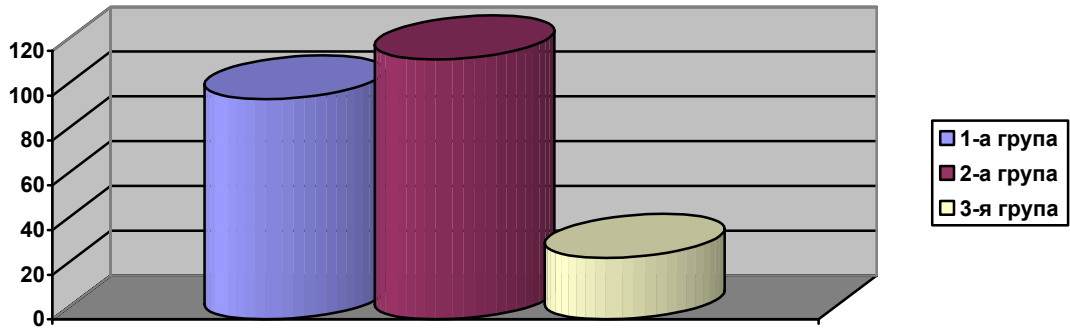


Рис. Ig класів M, A, G до антигенів HP

*- розбіжності достовірні ($p < 0,01$) в порівнянні з показниками у здорових осіб; 1- титри вказані в обернених одиницях

Таким чином, отримані результати свідчать про те, що інфікування HP стимулює системну продукцію антихелікобактерних Ig класів M, A, G значно частіше і в більш високих титрах, ніж в контрольній групі. Ці результати з одної сторони підтверджують дані [1,2] про те що HP здатний індукувати продукцію специфічних Ig достатньо високого рівня, а з іншої – протирічить широко розповсюдженому погляду на те, що у HP – інфікованих осіб титр антихелікобактерних антитіл низький і пов'язано це зі слабкою імуногенністю мембранних антигенів, зокрема, низькою біологічною активністю ліпополісахаридів клітинної стінки [3] або антигенною мімікрією, оскільки структура ліпополісахаридного O-антигену подібна до антигенів груп крові (*no Lewis*) макроорганізму [4] .

Поряд з тим, протективна роль специфічних антитіл при бактеріальних інфекціях неодноразово обговорювалася. Зокрема, при HP-інфекції вона полягає в інгібіції взаємодії мікроорганізмів з клітинами епітелію шлунку (SIgA), опсонізацією мікроорганізмів (IgG) і лізисі їх під впливом сумісної дії IgM та компліменту.

Залишається відкритим питання – чому присутність досить високого рівня специфічних Ig не захищає організм від інфекції? Одне з можливих пояснень цього факту може полягати в тому, що рівень визначених специфічних антитіл не здатний забезпечити адекватний протективний ефект, або ж більша частина утворених антитіл реагує з ідентичними епітопами епітеліальних клітин шлунку, утворюючи при цьому імунні комплекси, які не тільки не є компонентами захисту, але навіть здатні викликати пошкодження тканин. Крім того, високий рівень антитіл може свідчити про переважно Th 2 тип імунної відповіді, результатом якого є трансформація B-лімфоцитів в IgG-продукуючі плазмоцити, які, як відомо, не здатні забезпечити захист слизової оболонки шлунку. Раніше [5] нами було показано, що цей клас Ig є переважаючим у HP-інфікованих хворих.

Однак, це не виключає того, що дані про присутність специфічних антихелікобактерних антитіл у переважній кількості хворих на рак шлунку є додатковим критерієм і/або непрямою ознакою участі антигенів HP у підтриманні хронічного запального процесу слизової оболонки шлунку і її можливої неопластичної трансформації. Крім того, ці дані дозволяють, на наш погляд, говорити про можливість використання цього показника в якості додаткового критерію при формуванні груп підвищеного ризику появи HP-асоційованої онкопатології шлунку.

Відомі чисельні дані, які вказують на взаємозв'язок герпесвірусів із злоякісними новоутвореннями. Представлені докази асоціації EBV з лімфомою Беркіта, інфекційним мононуклеозом, назофарингіальною карциномою, HCMV - з саркомою Капоші, канцерогенною дією HSV при комбінованій дії з хімічними канцерогенами і зв'язок цих вірусів з предраковими захворюваннями шлунку [6,7,8] .

З метою уточнення патогенетичної ролі герпесвірусів в розвитку злоякісних новоутворень шлунку було проведено дослідження присутності серологічних маркерів

герпесвірусів (HSV, HCMV, EBV) в сироватках крові хворих, оперованих з приводу раку шлунку.

Всі обстежені особи були розділені на 4 групи. Вихідним матеріалом слугували сироватки крові у титрах 1:10, а для визначення титру антитіл у виявлених позитивних зразках проводили титрацію сироваток за допомогою 2-х кратних розведень.

В таблиці наведені дані, які характеризують рівень вірусспецифічних антитіл в групах обстежених осіб. Як видно з наведених результатів відсоток серопозитивних осіб (антиHSVантитіла) в 1 – 3 групах хворих склав від 71 до 95, при 57 % в 4-й (контрольній групі). Однак, середній титр IgG був достовірно ($p < 0,01$) вищим лише у пацієнтів 3-ї групи і перевищував аналогічний показник у здорових осіб більше ніж у 12 разів, причому у всіх (100 %) пацієнтів цієї групи титр антитіл був вище ніж 1:80. Цей показник в контрольній групі склав 37 %. Визначення анти-HCMV-антитіл показало, що високий відсоток серопозитивних осіб реєструвався в 1-й та 3-й групах, відповідно 78 і 89 % і суттєво нижче в 2-й та контрольній групах (48 % і 33 %, відповідно). Це також стосувалося і середнього титру антитіл в групах 1-й і 3-й в яких він склав 1180 ± 181 та 1413 ± 177 і перевищував цей показник в контрольній групі в 9 разів, причому титр антитіл більше 1:80 визначався у всіх пацієнтів цих груп. Відомо, що в процесі реплікації EBV експресується більше 70 різноманітних вірусспецифічних білків. Однак, в теперішній час ідентифіковані групи імуногенних білків, визначення антитіл до яких дає можливість використовувати ці дані як з метою діагностики, так і диференціальної діагностики стадій захворювання. Тест-система, яка була використана нами дає можливість верифікувати анти-EBV-антитіла до ядерного білка EBNA-1 (p-72), який є маркером реактивації вірусної інфекції. Рівень антитіл оцінювали (у відповідності з рекомендаціями) в умовних одиницях на мл (у.о./мл).

Отримані результати свідчили, що найбільший відсоток серопозитивних осіб реєструвався в 2-й та 3-й групах пацієнтів (77 та 68, відповідно) і в цих же групах середній рівень антитіл був суттєво ($p < 0,01$) вище (6,5 та 6,9 у.о./мл), ніж в контрольній групі (5,1 у.о./мл), причому у всіх пацієнтів цих груп титр антитіл був $> 5,1$ показника, який характеризував позитивний результат.

При аналізі отриманих результатів слід звернути увагу на наступне: присутність антигерпесвірусних антитіл в сироватках крові пацієнтів вказує не лише на присутність відповідних вірусів в організмі, але і про їх певну локалізацію, що підтверджується виявленням антигенів цих вірусів в тканині пухлин шлунку, видалених при оперативному втручанні з приводу раку шлунку. Відсутність вірусспецифічних антитіл в деяких випадках, яку ми спостерігали, може бути пов'язана з невеликим числом інфікованих клітин, тобто низьким вірусним навантаженням. А у випадках коли наявність антигерпесвірусних антитіл реєструвалося, а сам антиген не виявлявся у того ж хворого, може бути підтвердженням відомого факту, який полягає в тому, що у більшості випадків після трансформації малігнізуючий вірус зникає з клітини і вільна ДНК та його структурні білки в клітині не виявляються. У переважній більшості випадків серед обстежених пацієнтів позитивна гуморальна відповідь на герпесвіруси добре корелювала з виявленням самих вірусів в біоптатах тканини пухлини шлунку.

При співставленні результатів серологічних досліджень з частотою виявлення герпесвірусів в тканині пухлини хворих, оперованих з приводу раку шлунку, можна припустити, що сукупність цих даних вказує на реальну можливість асоціації цих вірусів з розвитком новоутворень відповідної локалізації. Виявлення маркерів цих вірусів може мати прогностичне значення на ранніх етапах онкопатології шлунку, враховуючи також той факт, що віруси можуть безпосередньо порушувати функції імунної системи, викликати імуносупресію, а виявлена асоціація маркерів герпесвірусів з клітинами пухлинної тканини може визначити передуючий розвитку пухлини імунодефіцит, на тлі якого ризик розвитку новоутворень відповідної локалізації значно вище.

Таблиця – Серологічні маркери герпесвірусів в сироватці крові 10 хворих на рак шлунку

Група обст-х	Число обст-х	HSV-Ig G			HCMV-Ig G			EBV-NA Ig G					
		Абс. число	% серопозитивних	Середній титр АТ (M±m)	% титрів в > 1:80	Абс. число	% серопозитивних	Середній титр АТ (M±m)	% титрів > 1:80	Абс. число	% серопозитивних	Середній титр АТ (M±m)	% титрів > 1:80
1	21	15	71	85,3 ±7,6	53	16	78*	1180,3 ±191,0**	100	8	38	5,18 ±0,2	75
2	39	37	95*	115,6 ±8,9	67	19	48	416,8 ±30,2	89	30	77	6,5 ±0,3**	100
3	27	23	85*	130,7 ±14,8	100	24	89*	1413,0 ±177,0**	100	18	68	6,9 ±0,4**	100
4	33	19	57	101,0 ±8,8	37	8	33	140,0 ±6,9	62	10	30	5,1 ±0,3	40

1-а група – НР-негативні хворі,

2-а група – НР-позитивні хворі,

3-я група – НР-герпесвірус позитивні хворі,

4-а група – контрольна (клінічно здорові особи).

* - розбіжності достовірні ($p < 0,05$) при порівнянні з контрольною групою,

** - розбіжності достовірні ($p < 0,01$)

Список літератури

1. Appelmelk B.J., Negrini R., Moran A. Petal. Molecular memory between *Helicobacter pylori* and the host // *Trends Microbiol.* – 1997. - № 5. – P.70-73.
2. Kovayaschi K., Sacamoto S., Kito T. Lewis blood group – related antigen expression in normal gastric epithelium intestinal metaplasia, gastric adenoma and gastric carcinoma // *Am.J. Gastroenterology.* – 1994. – Vol. 242. – P. 119-126.
3. Kirkland T.S., Viriykosol S., Pezez-Pezez G.I. *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide can activate 70Z/3 celes via CD14 // *Infect. Immunol.* – 1997. – V. 65. – P. 604-608.
4. Nirth H.P., Yang M., Peck R. Metal. *Helicobacter pylori* Lewis expression is related to the host Lewis phenotype. // *Gastroenterology.* – 1997. – V. 113. – P. 1031-1098.
5. Чернявський В.И., Бiryюкова С.В., Волянський Ю.Л. Состояние показателей иммунологической реактивности у больных при *Helicobacter pylori* – ассоциированных заболеваниях и их роль в механизмах ульцерогенеза // *Буковинський медичний вісник.* – 2003. – Т. 7. - № 1. – С. 175-179.
6. Hoh T., Tokunada M. Clinicopathology of EBV – related gastric carcinoma // *Neppon Rinsho.* – 1997. – Vol. 55. – P. 313-367
7. Kuzhetsova T., Urazova L., Isaeva T. Comparative study of EBV serological markers in patients with gastric cancer and chronic gastric discale // *J. Bion.* – 1998. - № 4. – P. 335-340.
8. Кологривава Е.Н., Шишков А.А., Черемисина О.В. и др. Результаты выявления маркеров герпесвирусов у пациентов с предраковыми заболеваниями легких и желудка // *Вопросы онкологии.* – 2003. – Т. 49. – № 2. – С. 156-159.

СЕРОЛОГІЧНІ МАРКЕРИ *H. PYLORI* ТА ГЕРПЕСВІРУСІВ У ХВОРИХ НА РАК ШЛУНКУ
Чернявський В.И., Бiryюкова С.В., Смелянська М.В., Перемот С.Д., Біляєвська С.Ю.,
Мартинів А.В., Крестецька С.Л.

Обговорюється ймовірна роль бактеріально-вірусних асоціацій (*H.Pylori* -*Herpesviridae*) в індукції злоякісної трансформації клітин гастродуоденальної зони та їх взаємопотенціруючий вплив на цей процес.

Ключеві слова: *Helicobacter pylori*, *Herpesviridae*, новоутворення шлунка, імунні механізми захисту.

СЕРОЛОГИЧНЫЕ МАРКЕРЫ *H. PYLORI* И ГЕРПЕСВИРУСОВ У БОЛЬНЫХ РАКОМ
ЖЕЛУДКА

Чернявский В.И., Бiryюкова С.В., Смелянская М.В., Пермот С.Д., Белявская С.Ю.,
Мартынов А.В., Крестецкая С.Л.

Обсуждается возможная роль бактериально-вирусных ассоциаций (*Helicobacter pylori*-*Herpesviridae*) в индукции злокачественной трансформации клеток гастродуоденальной зоны и их взаимопотенцирующее влияние на этот процесс.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*, *Herpesviridae*, новообразования желудка, иммунные механизмы защиты.

**SEROLOGICAL MARKERS OF H. PYLORI AND HERPESVIRIDAE FAMILY IN STOMACH
CANCER PATIENT'S**

Chernyavsky V.I., Biriukova S.V., Martynov A.V., Smelyanskaya M.V., Peremot S.D, Belyaevska S.Yu., Krestetska S.L.

The possible role of bacterial-viral association (*Helicobacter pylori*- Herpesviridae), in induction of malignant transformation of cells gastroduodenal zone and their mutual potentially influence on this process is discussed.

Key words: *Helicobacter pylori*, Herpesviridae, tumors of stomach, immunological mechanisms of defense.