

М.Р. КОНОРЕВ, В.К. ОКУЛИЧ,
И.И. ГЕНЕРАЛОВ,
С.А. СЕНЬКОВИЧ,
А.Г. ГЕНЕРАЛОВА
Витебский государственный
медицинский университет,
Республика Беларусь

УДК 577.15:616-097:579

УРЕАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТОВ IGG АНТИТЕЛ У HELICOBACTER PYLORI-ПОЗИТИВНЫХ ПАЦИЕНТОВ

Обследовано в клинике 40 НР-позитивных и 11 НР-негативных пациентов. Диагностика *H. pylori* осуществлялась морфологическим методом, с помощью быстрого уреазного теста и серологическим методом с определением антител класса IgG к НР. Выделение препаратов IgG (подклассы IgG₁, IgG₂, IgG₄) из сыворотки крови осуществлялось предложенным нами комбинированным методом (риванолсульфатно-аффиннохроматографический метод в комбинации с ионообменной хроматографией на DEAE-молселекте А-50). Уреазную активность фракции IgG сыворотки крови определяли по разработанной нами методике. Результат оценивали спектрофотометрически по степени распада мочевины. Фракция IgG НР-негативных пациентов не имела уреазной активности IgG и антител к НР в диагностических титрах. Поликлональные IgG у 35,0% НР-позитивных пациентов имели высокий уровень уреазной активности (7,3±1,5 пКат) и IgG антител к НР (2,21±0,16 ISR). Установлена корреляционная зависимость средней силы между уровнем уреазной активности IgG и уровнем IgG антител к НР в выделенной фракции ($r=0,62$; $p<0,05$). Показано, что персистенция *Helicobacter pylori* в желудке приводит к появлению в крови фракции IgG антител к *H. pylori* обладающей способностью ускорять распад мочевины.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: уреазы, IgG, абзимы, *Helicobacter pylori*.

UREASE-LIKE IGG ANTIBODIES IN H.PYLORI-POSITIVE PATIENTS

KONOREV M.R., OKULICH V.K., GENERALOV I.I., SENKOVICH S.A., GENERALOVA A.G.
Medical University, Vitebsk, Byelorussia

We selected 40 HP-positive and 11 HP-negative patients in the age range 21-61 for study. Examination of *H. pylori* was made by acridin orange fluorescence and the silver method of Warthin and Starry, urease test (Rohm Pharma, Germany) and by *H. pylori* IgG ELISA method (DAI, USA). Control of IgG purity performed with 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis in non-reducing conditions followed by Coomassie Blue R250 staining. For urease activity measurement urea (Serva) was used as a substrate. The activity of IgG fraction was determined using the degree of the urea desintegration. The IgG of HP-negative patients didn't demonstrate urease-like activity and had not IgG antibodies to *H. pylori*. The IgG of HP-positive patients showed the high level of urease activity (35,0%; 7,3+1,5 pCat; $p<0,01$) and IgG antibodies to *H. pylori* (2,21+0,16 ISR). A correlation was found between the level of IgG antibodies to *H. pylori* and the urease IgG activity ($r=0,62$; $p<0,05$). It can be considered that serum IgG antibodies to *Helicobacter pylori* of patients with persistents of HP in gastric mucosa have the urease-like activity.

В последнее время появились данные [8,11], показывающие, что бактериальная уреазы яв-

ляется основной мишенью для гуморального иммунного ответа среди различных антигенов *Helicobacter pylori* (HP) у инфицированных пациентов. В качестве основного антигена-мишени для создания человеческой вакцины против инфекции HP стали использовать уреазу, вырабатываемую бактерией [13,14]. Показано, что введение уреазы рег ос приводит в выработке специфического гуморального и клеточного иммунного ответа и защите организма мышей [10,15] и обезьян [9] от геликобактерной инфекции. В этих исследованиях основное внимание уделено идиотипическим антителам, направленным против уреазы бактерии. В связи с этим, нами была сформулирована гипотеза, согласно которой при наличии инфекции HP и бактериальной уреазы в организме человека, в результате идиотип-антиидиотипических взаимодействий, в крови появляются антитела, обладающие способностью расщеплять мочевины. Такие антитела получили название абзимов или abzymes (от английской аббревиатуры antibody-enzyme [12]). Так как уреазы не синтезируются в организме человека, то наличие уреазной активности антител подтверждает один из основных механизмов образования антител-ферментов. Таким образом, целью исследования явилось изучение уреазной активности IgG антител у пациентов с инфекцией *Helicobacter pylori*.

Материалы и методы. *Обследовано в клинике 40 HP-позитивных и 11 HP-негативных пациентов. Отбор больных производился рандомизированным методом [3,6]. Все пациенты прошли эндоскопическое исследование с прицельной биопсией антрального отдела и тела желудка из трех участков слизис-*

*той. Диагноз был выставлен на основании данных морфологического исследования биоптатов, окрашенных по методам Вартина-Старри, Романовско-му-Гимзе и акридиновым оранжевым [1]. Активность (количество нейтрофильных гранулоцитов в собственном слое слизистой оболочки), воспаление (количество лимфоцитов и плазматических клеток в собственном слое слизистой), атрофию определяли по 4-х балльной шкале: минимальная - 1, слабая - 2, умеренная - 3, выраженная - 4 [17]. Степень обсемененности HP также определяли по 4-х балльной шкале: отсутствие бактерий - 1, только немногочисленные бактерии фокально - 2, умеренное количество бактерий в нескольких областях - 3, изобилие бактерий в большинстве желез - 4 [16]. Диагностика *H. pylori* осуществлялась морфологическим методом, с помощью быстрого уреазного теста (Jatrox-H.p.-Test, Германия) и методом иммуноферментного анализа (ИФА) с определением антител класса IgG к HP (*H. pylori* IgG ELISA; Diagnostic Automation, Inc., США).*

Кровь брали утром натощак из локтевой вены на следующий день после поступления больного в стационар. Все иммуноглобулины (ИГ) выделялись из сывороток в день забора крови. Полученные образцы хранились в жидком азоте. Выделение препаратов IgG (подклассы IgG₁, IgG₂, IgG₃) из сыворотки крови осуществлялось предложенным нами комбинированным методом (риванолсульфатно-аффиннохроматографический метод [5] в комбинации с ионообменной хроматографией на DEAE-молселекте А-50). Степень очистки IgG определялась с помощью электрофореза в диссоциирующих условиях

с последующей окраской Coomassie blue R-250 и нитратом серебра [7]. На основании полученных данных был сделан вывод о том, что исследуемая фракция ИГ была гомогенной и принадлежала к IgG. Определение IgG антител к HP в полученной фракции проводилось с помощью ИФА набора (H. pylori IgG ELISA; Diagnostic Automation, Inc., США).

Уреазную активность фракции IgG сыворотки крови определяли по разработанной нами методике. Смешивали 0,1 мл IgG (1,5 мг/мл) и 0,1 мл субстрата (20 г/л мочевины и 2 г/л NaN₃ в 0,1 мл ФБР 0,1М, рН 7,2). Инкубировали при 37°C до появления достоверных различий между опытными и контрольными пробами (120 часов). Результат оценивали по степени распада мочевины (ммоль/л) с помощью набора реагентов BUN Reagent, ECO-MED-POLL (Австрия) и спектрофотометра "Spectrum II" (λ = 340 нм, Abbott, США). Перевод в международные единицы активности (Катал) осуществляли по формуле $Y = 4,6X$ пикоКатал (пКат), где X - количество распавшейся мочевины (ммоль/л). Контроль стерильности препаратов иммуноглобулинов с ферментативной активностью при инкубации при 37°C в течение 120 и 16 часов роста бактерий не выявил.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась на персональном компьютере модели IBM PC AT Pentium-II используя пакеты прикладных программ [2,4].

Результаты и обсуждение

Фракция IgG HP-негативных пациентов не имела уреазной активности и антител к HP в диагностических титрах. Поликлональные IgG у 35,0% HP-позитивных пациентов имели повышенный уровень уреазной активности (7,3+1,5 пКат) и IgG антител к HP (2,21+0,16 ISR). Установлена корреляционная зависимость средней силы между уровнем уреазной активности IgG и уровнем IgG антител к HP в выделенной фракции ($r=0,62$; $p<0,05$). Наличие уреазной активности IgG у пациентов инфицированных HP косвенно подтверждает идиотип-антиидиотипический механизм появления антител-ферментов. О бактериальном происхождении уреазной активности IgG свидетельствует взаимосвязь между IgG с уреазной активностью и IgG антителами к HP, а также отсутствие в организме человека собственной уреазы.

Выводы:

1. Впервые показано, что персистенция Helicobacter pylori в антральном отделе желудка приводит к появлению в крови фракции IgG антител к H. pylori обладающей способностью ускорять распад мочевины.

2. У пациентов с активной персистенцией Helicobacter pylori в слизистой желудка в сыворотке крови определяются IgG антитела к H. pylori коррелирующие с высоким уровнем уреазной активности (7,3+1,5 пКат).

3. У HP-негативных пациентов в сыворотке крови не определяются антитела к Helicobacter pylori и уреазная активность фракции IgG антител.

Литература

1. Аруин Л.И., Григорьев П.Я., Исаков В.А., Яковенко Э.П. Хронический гастрит. - Амстердам, 1993. - С. 297-301.
2. Григорьев С.Г., Перфилов А.М., Левандовский В.В., Юнкеров В.И. Пакет прикладных программ Statgraphics на персональном компьютере. Практическое пособие по обработке результатов медико-биологических исследований. - С-Пб., 1992. - 104 с.
3. Двойрин В.В., Клименков А.А. Методика контролируемых клинических испытаний. - М.: Медицина, 1985. - 144 с.
4. Дюк В. Обработка данных на ПК в примерах. - С-Пб.: Питер, 1992. - 231 с.
5. Конорев М.Р., Козловский И.В., Генералов И.И. Выбор метода очистки каталитических иммуноглобулинов для исследования их роли при инфекционной патологии // Вопросы патогенеза и терапии инфекционных и паразитарных заболеваний. - Витебск, 1993. - С. 60-63.
6. Лакин Г.Ф. Биометрия. - М., 1990. - С. 263.
7. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). - М., 1981. - 286 с.
8. Crabtree J. Eradication of chronic Helicobacter pylori infection by therapeutic vaccination // Gut. - 1998. - Vol.43. - P. 7-8.
9. Dubois A., Lee C.K., Fiala N., et al. Immunization against natural Helicobacter pylori infection in nonhuman primates // Infect.Immun. - 1998. - Vol.66, N9. - P.4340-4346.
10. Ermak T.H., Giannasca P.J., Nichols R., et al. Immunization of mice with urease vaccine affords protection against Helicobacter pylori infection in the absence of antibodies and is mediated by MHC class II-restricted responses // J.Exp.Med. - 1998. - Vol.188, N12. - P. 2277-2288.

11. Futagami S., Takahashi H., Norose Y., Kobayashi M. Systemic and local immune responses against H.pylori urease in patients with chronic gastritis. // Gut. - 1998. - Vol.43, N2. - P. 168-175.
12. Leatherbarrow R.J. Designer catalytic antibodies // Nature. - 1989. - Vol. 338. - P. 206-207.
13. Lee A. Prevention of Helicobacter pylori infection // Scand.J.Gastroenterol. - 1996. - Vol. 215, Suppl. - P. 11-15.
14. Lee A. Vaccination against Helicobacter pylori // J.Gastroenterol. - 1996. - Vol. 31, Suppl.9. - P. 69-74.
15. Michetti P. Oral immunization against Helicobacter pylori - a future concept // J.Gastroenterol. - 1998. - Vol.33, Suppl.10. - P. 66-68.
16. Price A.B. The Sydney system: histological division // J. Gastroenterol. Hepatol. - 1991. - Vol. 6. - P. 209-222.
17. Stolte M. Campylobacter pylori und Gastritis, Assoziation oder Induction? // Pathologie. - 1989. - Vol. 10. - P. 21-26.