

**Հեպատիտ C վիրուսի հանդեպ հակամարմիններում 1F7
իդիոտիպի արտահայտվածության
փոխկապակցվածությունը վիրուսային
ծանրաբեռնվածության և ամինոտրանսֆերազների
ակտիվության հետ**

Տ.Կ. Դավթյան¹, Մ.Ժ. Հովսեփյան²

*¹«Արմենիկում» ՓԲԸ Կլինիկական կենտրոն, ²«Արարկիր» բժշկական
համալիր - Երեխաների և դեռահասների առողջության ինստիտուտ*

*Բանալի բառեր. իդիոտոպ, իդիոտիպ, հեպատիտ C, վիրուսային
ծանրաբեռնվածություն, ամինոտրանսֆերազներ*

Իմունոգլոբուլինների կամ T բջիջների ռեցեպտորների փոփոխական տեղամասերի անտիգենային դետերմինանտները կոչվում են իդիոտոպեր, իսկ այդ իդիոտոպերի ագրեգատը՝ իդիոտիպ (Id): Առանձին իդիոտոպերի նկատմամբ առաջացած հակամարմինները, որոնք փոխազդում են իմունոգլոբուլինների առանձնահատուկ V տեղամասի հետ, կոչվում են հակաիդիոտիպիկ:

Id-ը առաջանում են B բջիջների օնտոգենեզի ժամանակ ձևավորվող առաջնային V ռեգիոնում ներկայացվելու միջոցով: Դա կատարվում է գենի վերադասավորման, ձևափոխության և կոմբինացիոն զուգավորման պատահական պրոցեսում: Եթե համապատասխան իդիոտոպը կազմվում է սադմնային վիճակով կոդավորված փոփոխական (V), տարատեսակության (D) կամ միավորող (J) գենային հաջորդականության մեջ՝ Id-ը լինում է ընդհանուր և արտահայտված տարբեր սպեցիֆիկության հակամարմիններում (ՀՄ): Դրան հակառակ, եթե իդիոտոպը բնութագրվում է առանձնահատուկ V-ծանր/V-թեթև շղթաների կոմբինացիայով՝ միավորելով իդիոսինկրատիկ, բնութագրական VD, VJ կամ DJ միացումները, համապատասխան Id-ը առաջանում է միայն անտիգենային սելեկցիայից կամ բջջային տրանսֆորմացիայից հետո: Id-ի այս տիպը սովորաբար լինում է անհատական (պոպուլյացիայի համար ընդհանուր չէ: և սահմանափակված է նույնատիպ սպեցիֆիկության մյուս ՀՄ-ից: Իմունոգլոբուլինների V յուրահատուկ գենի սեգմենտի անտիգենային սելեկցիան նպաստում է անհատական իմունոգլոբուլինների կազմում Id-ի արտահայտվածությանը իմուն կարգավորման պրոցեսում: Ընդհանուր Id-ի ավելացումը արտացոլում է պոպուլյացիայի մեջ գենետիկ, շրջակա միջավայրի կամ այլ կարգավորող հատկանիշների ընդհանրությունը:

Հեպատիտ C վիրուսն (ՀՎՎ) ունի թույլ իմունոգենություն, որով էլ պայմանավորված է դանդաղ և ոչ պրոտեկտիվ բջջային և հումորալ իմուն պատասխանների զարգացումը: Հումորալ պատասխանը իրականացնում է սպեցիֆիկ չեզոքացնող ՀՄ-ի (հակա-ՀՎՎ) արտադրությամբ, որոնք վարակի վաղ փուլում չեզոքացնում են վիրուսին, սակայն ՀՎՎ-ի մուտագիոն փախուստը բերում է նրա պերսիստենցիային և քրոնիկ վարակի առաջացմանը [1]: Այդ ՀՄ-ը միայնակ բավարար չեն լինում կանխելու և վերացնելու ՀՎՎ վարակը: Վիրուսից մաքրումը զուգակցվում է վարակի վաղ փուլում չեզոքացնող ՀՄ-ի արագ արտադրության հետ և դրան հակառակ, չեզոքացնող ՀՄ-ի քիչ քանակությունը վաղ փուլում և այդ ՀՄ-ի ուշացած արտադրությունը զուգակցվում է քրոնիկ վարակի հետ: Քրոնիկ վարակված հիվանդների մոտ առկա չեզոքացնող ՀՄ-ները խաչաձև ռեակտիվ են լինում վիրուսի տարբեր գենոտիպերի նկատմամբ, այսինքն հնարավորություն են ունենում փոխազդելու նմանատիպ անտիգենների հետ [2]: Այդ հակա-ՀՎՎ տարբեր սպեցիֆիկության ՀՄ-ում առաջանում է ընդհանուր 1F7 Id-ի արտահայտվածություն՝ զուգակցված B բջիջների կլոնալ դոմինանտության հետ [3]: 1F7 Id-ը չի սահմանափակվում միայն առանձնահատուկ VH գենով և առաջանում է ՄԻԱՎ, ՀՎՎ և կապիկի իմունոդեֆիցիտի վիրուսի դեմ առաջացած ՀՄ-ում [4, 5]:

Սուր ՀՎՎ վարակը մոտ 15-30% դեպքերում ինքնուրույն վերանում է, իսկ մնացած դեպքերում քրոնիկ պաթոգենի հետ B1B բջիջների փոխազդեցությունը՝ բերում է այդ բջիջների կոդմից արտադրված հակա-վիրուսային ընդհանուր, խաչաձև ռեակտիվ 1F7 Id-ի ավելացմանը [6]: Ըստ վերջին ուսումնասիրությունների՝ անհատները, որոնք մաքրվել են ՀՎՎ վարակից, ունեն 100% T բջջային պատասխան, բայց թույլ հակա-ՀՎՎ ՀՄ-ի պատասխան համեմատած այն անհատների խմբի հետ, որոնց մոտ զարգացել էր քրոնիկ վարակ [7]: Սակայն դեռ հասկանալի չէ, թե ինչպես է ընդհանուր Id արտահայտող B1 կամ B2 բջիջների կլոնալ դոմինանտության հաստատումը ՀՎՎ վարակի վաղ փուլում արգելակում հումորալ իմուն պատասխանի ադապտացիան նոր առաջացող վիրուսի մուտանտների դեմ և նպաստում քրոնիկ ՀՎՎ վարակի առաջացմանը, ինչպես նաև լյարդի իմուն միջնորդավորված ախտահարմանը:

Մեր աշխատանքի նպատակն է՝ ուսումնասիրել ՀՎՎ վարակի ժամանակ ընդհանուր, խաչաձև ռեակտիվ 1F7 Id-ի քանակությունը հակա-ՀՎՎ ՀՄ-ում և նրա փոխկապակցվածությունը վիրուսային ծանրաբեռնվածության, շիճուկային ամինոտրանսֆերազների ակտիվության հետ:

Նյութը և մեթոդները

ՀՎՎ-ով վարակված 88 անհատների արյան նմուշների հետազոտությունները կատարվել են «Արմենիկում» կլինիկական կենտրոնի գիտահետազոտական լաբորատորիայում, Երևանի պետական բժշկական համալսարանի ինֆեկցիոն հիվանդությունների ամբիոնում և «Արաբիկ»

բժշկական համալիր - Երեխաների և դեռահասների առողջության ինստիտուտի լաբորատորիայում: Հիվանդներն եղել են ազգությամբ հայ՝ 72 տղամարդ և 13 կին, որոնց տարիքը տատանվում էր 14-72 տարի (միջին տարիքը $38 \pm 12,9$):

Արյան նմուշները վերցվել են մինչև հակավիրուսային բուժումը կամ բուժման ավարտից առնվազն 6 ամիս անց:

3 հիվանդների որոշ իմունոլոգիական հետազոտության տվյալներ օգտագործվել են արդյունքների վերլուծության ընթացքում, սակայն նրանք դուրս են եկել հետագա հետազոտություններից:

85 հիվանդներից ՀՇՎ-ի ծանրաբեռնվածության հետազոտություն իրականացվել է 57-ի և գենոտիպի որոշում 45-ի մոտ:

31 հիվանդներ 6 ամսվա ընթացքում ստացել են հակավիրուսային բուժում, որոնցից 20-ը մաքրվել են ՀՇՎ-ից և բժիշկների կողմից գնահատվել են որպես կայուն վիրուսոլոգիական պատասխանողներ: 7 հիվանդ հակավիրուսային բուժմանը չի պատասխանել:

Հակա-ՀՇՎ-ի հայտնաբերումը արյան շիճուկում իրականացվել է հակա-ՀՇՎ-ի որոշման երկրորդ կամ երրորդ սերնդի կոմերցիոն հավաքածուներով: ՀՇՎ-ի պոկայությունը որոշվել է վիրուսի Ռ-ՆԹ-ի հայտնաբերմամբ (որակական հետազոտություն) և գնահատվել է վիրուսի քանակությունը (վիրուսային ծանրաբեռնվածություն): Այդ հետազոտությունները իրականացվել են պոլիմերազային շղթայական ռեակցիայի (PCR) մեթոդով Roche ֆիրմայի Cobas Amplicor անալիզատորով: Օգտագործվել են Roche ֆիրմայի Amplicor HCV RNA, HCV Monitor test 2,0 հավաքածուները: Վիրուսային ծանրաբեռնվածությունը որոշող հետազոտության դետեկցիայի շեմը 500 ՄՄ/մլ է, իսկ որակական հետազոտությանը՝ 50 ՄՄ/մլ է: Մեթոդի զգայունությունը 99 % է, սպեցիֆիկությունը՝ 98,6%:

1F7 Id-ի որոշումը հակա-ՀՇՎ ՀՄ-ում իրականացվել է կարծր ֆազային իմունոֆերմենտային մեթոդով՝ Immulon-2 հավաքածուով (VWR Scientific, Mississauga ON):

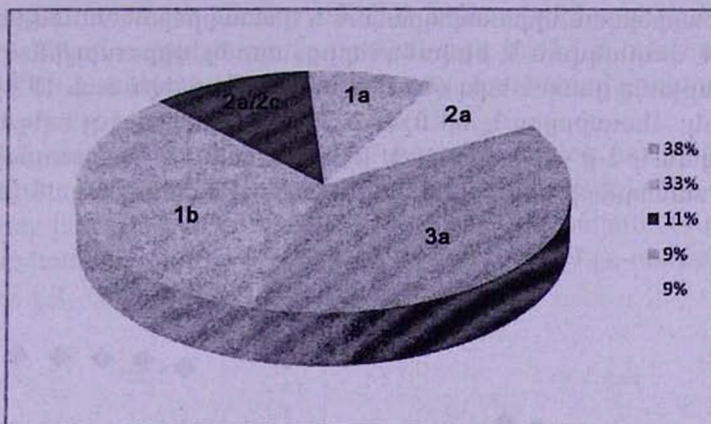
Շիճուկային ալանինամինոտրանսֆերազի (ALT), ասպարտատ-ամինոտրանսֆերազի՝ (AST) որոշումը իրականացվել է ավտոմատ բիոքիմիական անալիզատորով (LISA 500 PLUS, Hycel Diagnostics):

Վիճակագրական հետազոտությունները իրականացվել են պարամետրիկ և ոչ պարամետրիկ դիսպերսիոն մեթոդով, օգտագործելով Graph Pad Prism v 4.01 ծրագիրը: Տվյալներն օգտագործվել են հաշվելու համար միջին արժեքները, ըստ Student-ի թեստի (Pt), զուգավորման t - թեստի (Pp), Wilcoxon-Mann-Whitney և Welchs թեստի (Pw), $P < 0.05$ տարբերությունները գնահատվել են վիճակագրորեն նշանակալի:

Արդյունքները և դրանց քննարկումը

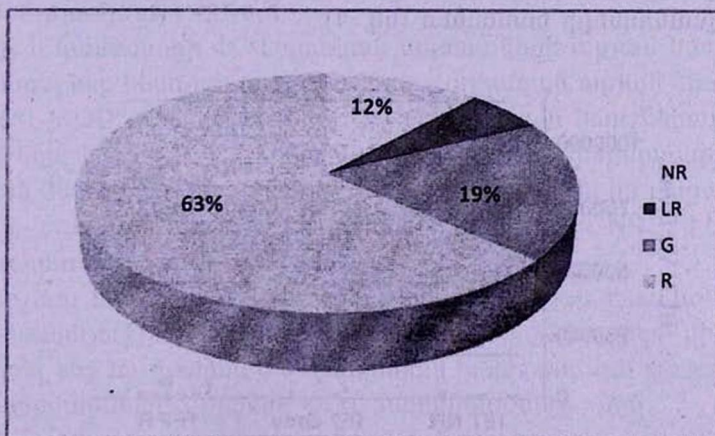
Մեր կողմից կատարված վերլուծությունները ցույց տվեցին, որ 45 հիվանդներից 17-ը (37,7%) ունեին 3a գենոտիպ, 15-ը (33,3 %)՝ 1b, 4-ը (8,8 %)՝ 1a, 4-ը (8,8%)՝ 2a, 5-ը (11,1%)՝ 2a/2c (նկ. 1): ՀՇՎ-ի տարբեր

գենոտիպերի և հակա-ՀԿՎ-ում 1F7 Id-ի քանակության միջև որևէ փոխկապակցվածություն չենք հայտնաբերել:



Նկար 1. Հիվանդների բաշխումը ըստ ՀԿՎ-ի տարբեր գենոտիպերի

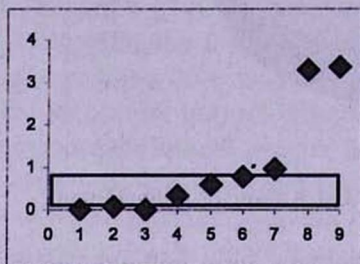
Մեր հետազոտությունների արդյունքները ցույց տվեցին, որ 85 հիվանդներից 10-ի մոտ (12%) հակա-ՀԿՎ-ում 1F7 Id չի հայտնաբերվել (օպտիկական խտությունը՝ OD ցածր է եղել 0,100-ից): Այս հիվանդները մեր կողմից առանձնացվել են որպես 1F7- չպատասխանողներ (NR): 5 հիվանդների մոտ (6%) հակա-ՀԿՎ-ում 1F7 Id-ը եղել է թույլ դրական (OD մեծ է եղել 0,100-ից և փոքր 0,200-ից): Սրանց առանձնացրել ենք որպես 1F7- թույլ պատասխանողներ (LR): 16 հիվանդների մոտ (19%) հակա-ՀԿՎ-ում 1F7-ը եղել է դրական (OD մեծ է 0,200-ից և փոքր 0,700-ից): Այս հիվանդներն առանձնացվել են որպես 1F7- պատասխանողներ (Gray), իսկ մնացած 54 հիվանդների մոտ (63%) հակա-ՀԿՎ-ում 1F7-ը եղել է խիստ դրական, որոնց էլ առանձնացրել ենք որպես 1F7-ուժեղ պատասխանողներ (R) (նկ. 2):



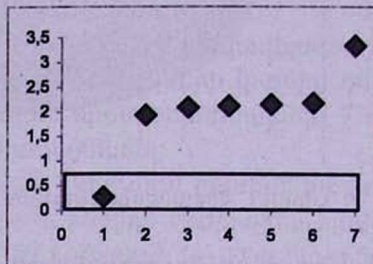
Նկար 2. 1F7 Id-ի քանակության հարաբերակցությունը NR, LR, Gray և R խմբերում

Այսպիսով, պայմանականորեն 1F7 NR, LR, Gray և R չորս տարբեր խմբերի բաժանած հիվանդների մոտ համեմատել ենք, թե ինչպես են այդ խմբերը տարբերվում վիրուսոլոգիական և կենսաքիմիական տվյալներով:

ՀՀ վարակված 9 հիվանդներից, որոնց վիրուսային ծանրաբեռնվածությունը ցածր է եղել 600 ՍՄ/մլ-ից, 7-ը ունեին նաև 1F7-ի ցածր մակարդակ: Հետաքրքիր է, որ նշված 7 հիվանդներից 5-ը եղել են 1F7-բացասական և 2-ը՝ 1F7-դրական: Մյուս կողմից՝ 7 վիրուսոլոգիապես չպատասխանողների մեջ միայն մեկն է եղել 1F7-բացասական (նկ. 3):



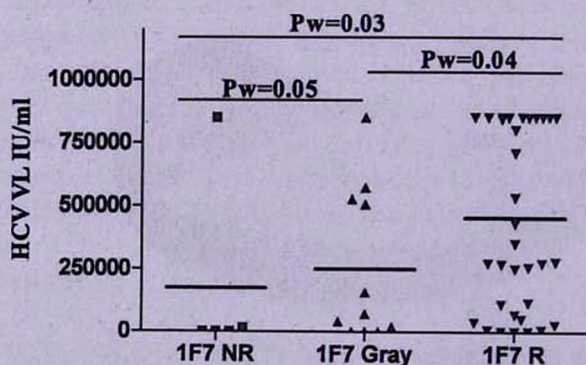
U



R

Նկար 3. 1F7 իդիոտիպի OD -ի տեղաբաշխումը 600 ՍՄ/մլ-ից ցածր վիրուսային ծանրաբեռնվածությամբ հիվանդների (U) և վիրուսոլոգիապես չպատասխանողների (R) մոտ

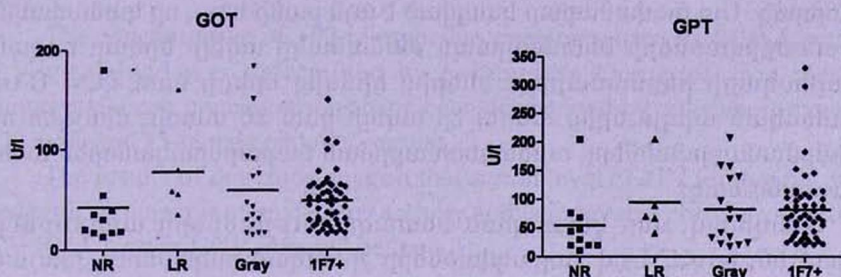
Մենք հետազոտել ենք վիրուսային ծանրաբեռնվածությունը 1F7 NR, Gray և R խմբերում: Ինչպես երևում է նկար 4-ից՝ վիրուսային ծանրաբեռնվածությունը նշանակալից ցածր է 1F7 չպատասխանողների մոտ, համեմատած՝ 1F7 պատասխանողների և 1F7 ուժեղ պատասխանողների հետ, իսկ 1F7- պատասխանողների մոտ նշանակալից ցածր է 1F7 ուժեղ պատասխանողների համեմատ (նկ. 4):



Նկար 4. Վիրուսային ծանրաբեռնվածությունը 1F7 NR, 1F7 Gray և 1F7 R խմբերում

Նշված խմբերում շիճուկային ULS-ի և UUS-ի մակարդակների վերաբերյալ ստացել ենք հետևյալ տվյալները՝ ULS-ի միջին մակարդակը 1F7 NR խմբում նշանակալից ցածր է 1F7 LR և R խմբերի համեմատ ($77,4 \pm 21$ U/L և $59,1 \pm 12,5$ U/L): 1F7 LR և Gray խմբերում ULS-ի միջին մակարդակների տարբերությունը նշանակալից չէ 1F7 R խմբի համեմատ ($48,6 \pm 3,6$ U/L), սակայն ULS-ի մակարդակը նշանակալից տարբեր է 1F7 LR և Gray խմբերում ($P < 0,0001$) (նկ. 5):

Մենք ստացել ենք նմանատիպ տվյալներ UUS-ի մակարդակի համար: UUS-ի մակարդակը բարձր է 1F7 LR խմբում ($94,4 \pm 28,9$ U/L, $P = 0,04$), Gray խմբում ($81,7 \pm 15,1$ U/L, $P = 0,05$) և R խմբում ($81,6 \pm 8,2$ U/L, $P = 0,02$) համեմատած՝ 1F7 NR-ի հետ ($54,1 \pm 18,0$ U/L), տարբերությունը չկար 1F7 LR, Gray և 1F7 R խմբերում (նկ. 5):



Նկար 5. Շիճուկային ամինոտրանսֆերազների մակարդակների տարբերությունը 1F7 Id բացասական (NR), ցածր (LR), դրական (Gray) և բարձր ցուցանիշով (R) խմբերում:

Նախկինում կատարված մեր հետազոտություններում մենք համեմատել ենք աշխարհագրական և էթնական տեսակետից իրարից տարբեր երկու խմբերում ՀՇՎ-ից ինքնամաքրված սուրյեկտների և քրոնիկ վարակվածների մոտ հակա-ՀՇՎ ՀՄ-ի ցուցանիշները և 1F7 Id-ի արտահայտվածությունը այդ ՀՄ-ում:

Հայ և կանադացի ՀՇՎ դրական անհատների արյան մուշներում մենք ստացել ենք հետևյալ արդյունքները: Հայկական արյան մուշներում հակա-ՀՇՎ-ի OD եղել է $0,47 - 3,5$: 54 կանադական մուշներում հակա-ՀՇՎ OD եղել է $0,9 - 2,6$: Երկու մուշներում, որոնք ինքնամաքրվել էին ավելի քան 20 տարի առաջ, հակա-ՀՇՎ core ՀՄ-ը եղել են բացասական, բայց ՀՇՎ-ի առկայությունը հաստատվել էր հակա-ՀՇՎ NS 3, 4 և 5 ՀՄ-ի հայտնաբերումով:

Որոշելու համար, թե արդյոք կա որևէ զուգակցում հակա-ՀՇՎ-ում 1F7 Id-ի առկայության և հիվանդության զարգացման ելքերի միջև, մենք համեմատել ենք հայկական և կանադական խմբերում այդ ցուցանիշները ինքնամաքրվածների և քրոնիկ ՀՇՎ վարակվածների մոտ:

ՈւՆԹ բացասական արդյունքով 5 կանադական և 8 հայկական մուշներ եղել են ինքնամաքրվածներ: Կանադացի ինքնամաքրվածների

մոտ հակա-ՀԿՎ-ի միջին OD նշանակալի ցածր էր համեմատած քրոնիկ ՀԿՎ վարակվածների հետ ($0,73 \pm 0,75$ ի դեմս $1,90 \pm 0,52$, $p < .01$) և շատ աննշան տարբերություն է եղել հայկական խմբում ($2,24 \pm 0,88$ ի դեմս $2,85 \pm 0,66$, $p < .01$):

1F7 Id-ի միջին քանակությունը հակա-ՀԿՎ ՀՄ-ում ինքնամաքրվածների մոտ ցածր է եղել քրոնիկ վարակվածների համեմատ (կանադացիների մոտ՝ $0,15 \pm 0,29$ ի դեմս $1,71 \pm 1,05$, $p < .001$; հայերի մոտ $0,76 \pm 1,12$ ի դեմս $1,60 \pm 1,08$, $p < .05$): Այսպիսով, երկու խմբերում էլ ինքնամաքրվածների և քրոնիկ վարակվածների հակա-ՀԿՎ -ում 1F7 Id-ի քանակության նշանակալի տարբերություններ կան: Եթե սուր ՀԿՎ վարակը ավարտվում է ինքնամաքրումով, ապա 1F7 Id-ի առկայությունը աստիճանաբար վերանում է: Կանադական, բայց ոչ հայկական խմբում ինքնամաքրվածները քրոնիկ վարակվածների համեմատ ունեն հակա-ՀԿՎ - ի ցածր միջին մակարդակ: Սա հավանաբար կապված է այն բանի հետ, որ կանադական ինքնամաքրվածների հետմաքրման ժամանակը ավելի երկար է, քանի որ կանադացի ինքնամաքրվածներից հինգից երեքի մոտ ՀԿՎ Ռ-ՆԹ բացասական արդյունքից անցել էր ավելի քան 20 տարի, մինչդեռ ուր հայ ինքնամաքրվածները ունեն հետմաքրման հարաբերականորեն ավելի կարճ ժամանակ:

Այսպիսով, մեր կատարած հետազոտությունների արդյունքները վկայում են, որ ՀԿՎ-ով վարակվածների շիճուկում ընդհանուր, խաչաձև ռեակտիվ 1F7 Id-ի մակարդակը ուղղակի հարաբերակցվում է շիճուկային ամինոտրանսֆերազների ակտիվության և հակադարձ հարաբերակցվում է վիրուսային ծանրաբեռնվածության հետ:

Поступила 23.02.11

Корреляция уровня экспрессии идиотипа 1F7 в антителах к вирусу гепатита С с вирусной нагрузкой и активностью аминотрансфераз

Т.К. Давтян, М.Ж. Овсепян

Цель работы – изучение корреляций между концентрацией общего, перекрестно реактивного идиотипа 1F7 в антителах к вирусу гепатита С с вирусной нагрузкой и активностью сывороточных аминотрансфераз у больных, инфицированных вирусным гепатитом С.

Исследования проводились у 85 лиц (72 мужчин и 13 женщин), инфицированных вирусом гепатита С. Для определения уровня идиотипа 1F7 использовали метод иммуноферментного анализа, вирусной нагрузки – метод полимеразной цепной реакции, концентрации аминотрансфераз – колориметрический метод.

Результаты исследований показали, что у больных, инфицированных вирусом гепатита С, существует прямая корреляция уровня идиотипа 1F7 с активностью сывороточных аминотрансфераз и обратная корреляция с вирусной нагрузкой.

Correlation of 1F7 idiotype level of antibodies against hepatitis C virus with aminotransferases activity and HCV RNA load

T. K. Davtyan, M.Zh. Hovsepyan

The aim of the study is to find out if there is any correlation between the level of common, cross-reactive 1F7 idiotype in antihepatitis C antibodies and aminotransferases activity, and viral load determination in 88 HCV infected patients.

The concentration of 1F7 idiotype has been measured by ELISA method, HCV viral load was determined by polymerase chain reaction method, aminotransferases concentrations have been determined by colorimetric method in 72 male and 13 female patients' serums.

The results of our study suggest that serum level of 1F7 idiotype is correlated with serum aminotransferases activity and is in reverse correlation with the HCV RNA load in HCV infected patients.

Գրականություն

1. Michael D. Grant. Antibody convergence along a common idiotypic axis in immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections. *J. Med. Virol.*, 2002; 66; 13-21
2. Shimizu Y.K., Hijikata M., Iwamoto A., Alter H.J., Purcell R.H., Yoshikura H. Neutralizing antibodies against hepatitis C virus and the emergence of neutralization escape mutant viruses. *J. Virol.*, 1994; 68; 1494-1500.
3. Tigran K. Davtyan, Marine J. Hovsepyan, Levon M. Mkhitarian, Gagik S. Hakobyan, Aiden Brazil, Lisa Barrett, Geri Hirsch, Kevork M. Peltekian and Michael D. Grant The 1F7 idiotype is selectively expressed on CD5+ B cells and elevated in chronic hepatitis C virus infection. *Immunology and Cell Biology*; 2009, 87; 457-463.
4. Muller S., Wang H., Silverman G.J., Bramlet G., Haigwood N., Kohler H. B-cell abnormalities in AIDS. Stable and clonally-restricted antibody response in HIV-1 infection. *Scand. J. Immunol.*, 1993; 38; 327-334.
5. Grant M., Whaley M., Mayne A., Hoffmann G., Ansari A.A. Similar abnormalities of idiotype and immunoglobulin light chain expression and cell-mediated cytotoxicity in HIV infected humans and simian immunodeficiency virus SIV-infected rhesus macaques. *Immunol. Cell. Biol.*, 1996; 174; 38-44.
6. Bartosch B., Bukh J., Meunier J.C. et al. In vitro assay for neutralizing antibody to hepatitis C virus, evidence for broadly conserved neutralization epitopes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100; 14199-204.
7. Kaplan D.E., Sugimoto K., Valiga M.E., Ikeda F., Aytaman A. et al. Discordant role of CD4 T cell response relative to neutralizing antibody and CD8 T cell responses in acute hepatitis C. *Gastroenterology*, 2007; 132; 654-666.