

Уровень противовирусных антител к вирусу Эпштейна-Барр у больных раком мочевого пузыря

The level of Epstein-Barr virus antibodies in patients with bladder cancer

O.B. Loran, L.A. Sinyakova, L.V. Gundorova, V.A. Kosov, I.V. Kosova, D.N. Kolbasov, V.O. Zernov, A.A. Goncharov, Yu.V. Kandinova

Fifty-four patients (44 men and 10 women) were examined and treated with the mean age of 64.6±9.93 years (range 38-90), which were referred to the emergency urological departments due to the macrohematuria. All patients were investigated according to standards with additional detection (enzyme-linked immunosorbent assay) of the IgG and IgM to the type 1 and 2 herpes viruses (HSV), cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr virus (EBV), with PCR of the urine and tumor tissue using the assay to these viruses, urethral swab for the human papilloma viruses (HPV) of the high oncogene risk. Pathological stage was T1NxM0 in 63% of patients (n=34), T2N0M0 – in 12 patients (22.2%) and locally advanced disease was detected in 8 cases. Multiple tumors were present in 28 patients. From the pathological point of view, 68.5% had an urothelial cancer with high malignancy potential, 12 patients – with low malignancy potential. The tumors were recurrent in 15 patients. In patients with recurrent tumors, high malignancy potential of the tumor and locally advanced tumors anti-EBV Ig-EBNA (level of the antigens to nuclear antigen of EBV) was higher than that in the patients with non-invasive tumors and low malignancy potential. The patients with low-grade tumors and initially detected locally-advanced tumors had an prominently increased level of the antibodies to the capsid protein (anti-EBV IgG-VCA). The patients with tumors of high malignancy potential, advanced local disease and high rate of disease relapse the level of the antibodies to the early phase proteins was higher (anti-EBV IgG-EA). The higher antigen titer correlated with increased level of the antibodies of other investigated viruses, presence of EBV and other viruses in tumor, and with the disease stage.

О.Б. Лоран¹, Л.А. Синякова¹, Л.В. Гундорова³, В.А. Косов⁴, И.В. Косова², Д.Н. Колбасов², В.О. Зернов², А.А. Гончаров², Ю.В. Кандинова³

¹ФГОУ РМАПО, кафедра урологии и хирургической андрологии

²ГБУЗ ГКБ №68 ДЗМ, урологическое отделение

³ГБУЗ ГКБ №68 ДЗМ, патологоанатомическое отделение

⁴Коми республиканский онкологический диспансер (КРОД)

В настоящее время в литературе обсуждается вопрос об этиологической роли инфекционных агентов, в частности, вирусов в генезе развития опухолей мочевого пузыря, их влиянии на частоту рецидивирования и развития инвазивных и метастатических его форм. Вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ) является представителем онкогенных ДНК-содержащих вирусов, и диапазон онкологических заболеваний, ассоциированных с ним, постоянно увеличивается: доказано участие ВЭБ в развитии лимфомы Беркитта, назофарингеальной карциномы, волосатой лейкоплакии, рака желудка [1, 2]. В литературе есть указания на выявление лимфоцитов, содержащих ВЭБ, у пациентов с более ранними стадиями опухолевого процесса мочевого пузыря [3, 4].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено обследование и лечение 54 больных (44 мужчины и 10 женщин) в возрасте от 38 до 90 лет (средний возраст 64,6±9,93), поступивших в урологическое отделение ГКБ №68 и урологическое отделение Коми республиканского онкологического диспансера (КРОД) в большинстве случаев в экстренном порядке в связи с макрогематурией. Всем пациентам выполнены следующие исследования: общий анализ крови и мочи, ультразвуковое исследование (УЗИ) почек, мочевого пузыря, анализ крови на IgG, IgM к герпесу (HSV) I и II типа,

цитомегаловирусу (CMV), вирусу Эпштейна-Барр (EBV), ПЦР мочи к вышеуказанным вирусам, соскоб из уретры на выявление вируса папилломы человека (HPV) высокого онкогенного риска, магнитно-резонансная томография (МРТ) по показаниям, рентгенография органов грудной клетки.

В работе использовались общепринятые методы статистической обработки данных – все числовые показатели проверялись на соответствие нормальному закону распределения с помощью критерия Лиллиефорса, определялись средние значения (M), стандартное отклонение (SD), ошибка среднего (m), в работе данные представлены как $M \pm m$, 95% доверительный интервал, частоты (%). Различия между количественными показателями осуществлялась с помощью t-критерия Стьюдента для независимых выборок или непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Различия между частотой признаков находились с помощью критерия χ^2 , точного критерия Фишера. Для малых выборок, для случаев частоты равной 0% или 100% использовался t-критерий Стьюдента для частот с поправкой на концевые точки. Для определения связи между изучаемыми параметрами применяли корреляционный анализ Пирсона (r) или Спирмена (R). Статистически значимыми принимались различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Стадия процесса соответствовала T1NxM0 у 34 (63%) больных, в

одном случае выявлена папиллома мочевого пузыря, T2N0M0 – у 12 (22,2%) больных, в 8 случаях имел место местнораспространенный процесс. Примерно в половине случаев (у 28 больных) выявлено множественное поражение мочевого пузыря, в остальных – единичные опухолевые образования. При патоморфологическом исследовании уротелиальный рак с высокой степенью злокачественности выявлен у 37 (68,5%) больных, в одном случае – папиллома, у 12 больных – рак с низким потенциалом злокачественности. Опухоль была рецидивная у 15 пациентов.

Антитела класса иммуноглобулинов М (IgM) к капсидному антигену (viral capsid antigen — VCA) появляются одновременно с клиникой острой ВЭБ инфекции, сохраняются в течение 2–3 месяцев, повторно синтезируются при реактивации вируса. Длительная персистенция высоких титров этих антител характерна для хронической ВЭБ инфекции, опухолей, вызванных хронической ВЭБ инфекцией, аутоиммунных заболеваний, вторичных иммунодефицитных состояний [2, 5-9]. В нашем исследовании уровень этих антител составил $9,6 \pm 3,62$ ед/мл, при этом у пациентов с местно-распространенным раком уровень их был выше – $12,11 \pm 8,8$ ед/мл ($p > 0,05$). Также в группе пациентов с высококодифференцированным уротелиальным раком уровень антител был выше, чем средний – $11,26 \pm 7,51$ ед/мл. Однако такие показатели считаются сомнительными по отношению к референсным значениям (положительным считается результат при уровне антител более 40 ед/мл). Ситуация изменяется при анализе иммуноглобулинов G (IgG) к капсидному антигену. Так, среднее значение составило 365 ± 269 ед/мл (положительный результат – более 20 ед/мл), при этом уровень антител при первичном поражении и высококодифференцированных опухолях был несколько выше, чем при рецидивных и низкокодифференцированных ($372 \pm 43,81$ ед/мл и $388 \pm 233,88$ ед/мл по сравнению с $344,85 \pm 274,87$ ед/мл и $377 \pm 50,88$ ед/мл

соответственно, $p > 0,05$). Данные статистически недостоверны из-за небольшой выборки и неравномерного распределения их в группе. Антитела класса иммуноглобулинов G (IgG) к раннему антигену (early antigen — EA) достигают высокого титра на 3–4-й неделе острой ВЭБ инфекции и исчезают через 2–6 месяцев. Они появляются при реактивации, отсутствуют при атипичной форме заболевания. Высокие титры антител к раннему антигену выявляют при хронической ВЭБ инфекции, вызванных вирусом раковых и аутоиммунных заболеваний, иммунодефицитных состояниях [2, 5-9]. У наших пациентов IgEA более 40 ед/мл (положительный) был выявлен у 5 больных с низкокодифференцированными опухолями, в одном случае опухоль была рецидивная, у трех был выявлен мышечно-инвазивный рак (T2-T4), в двух случаях в опухоли была выявлена ДНК ВЭБ. При сомнительных результатах (от 20 до 40 ед/мл) у двух больных со стадией T1N0M0 выявлена низкокодифференцированная опухоль с безрецидивным периодом около 4 месяцев в одном случае. У двух больных имел место местно-распространенный рак.

Антитела класса иммуноглобулинов G к ядерному антигену вируса (EBNA) (положительный результат более 20 ед/мл) появляются через 1–6 месяцев после первичной инфекции. Затем их титр уменьшается и сохраняется в течение всей жизни. При реактивации ВЭБ инфекции происходит повторное увеличение их титра [2, 5-9]. При реактивации Эпштейна – Барр вирусной инфекции возможно

развитие различных клинических форм (аутоиммунных процессов, генерализованной инфекции, гемофагocитарного синдрома и т.д.) в том числе и развитие онкологических заболеваний [10-13]. Как видно из рисунка 1, уровень антител IgG – EBNA у больных с рецидивными опухолями примерно в два раза выше, чем с первичными ($p = 0,03$), то есть реактивация вирусной инфекции у этой категории больных в течение жизни происходит чаще, что, возможно, и обуславливает возникновение рецидива. Аналогичную картину мы получили и в отношении степени анаплазии и стадии процесса. Так, средний уровень антител при низкокодифференцированных опухолях составил $173,3 \pm 221,21$ ед/мл, при высококодифференцированных – $129 \pm 135,05$ ед/мл ($p > 0,05$). При стадии T1 средний уровень антител колебался в пределах $156,88 \pm 179,5$ ед/мл, тогда как при местно-распространенном раке мочевого пузыря их уровень составил $167,6 \pm 267,4$ ед/мл ($p > 0,05$). Несмотря на статистическую недостоверность результатов, имеет место тенденция к увеличению уровня anti-EBV IgG – EBNA в зависимости от стадии процесса и степени анаплазии.

Материалом для ПЦР – анализа на ВЭБ инфекцию служат кровь, ликвор, слюна, мазки со слизистой ротоглотки, биоптаты органов и др. Чувствительность ПЦР составляет 70–75%, что значительно ниже, чем при других герпесвирусных инфекциях (95–100%). Это связано с появлением ВЭБ в биологических жидкостях лишь **при иммуноопосредованном лизисе инфицированных В-лимфоцитов** [2, 5-9]. В нашем исследовании мы обнаружили ВЭБ в опухоли у 9 больных. Следует сразу оговориться, что в большинстве случаев выполнялась ТУР стенки мочевого пузыря с опухолью. При небольших размерах опухоли мы не исключаем термическое поражение ДНК вируса, вследствие чего даже при наличии высоких уровней антител ДНК вируса не выделялось. В большинстве случаев опухоль была низкокодифференцированная (у 6 больных). ■

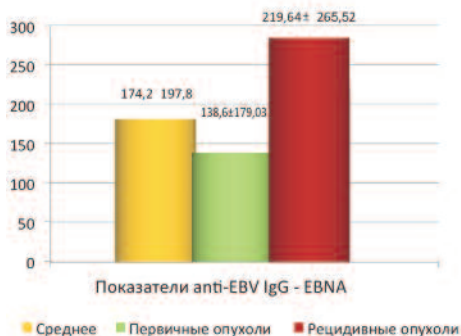


Рис. 1. Показатели уровня антител IgG-EBNA у больных раком мочевого пузыря

Корреляционные закономерности уровня антител к ВЭБ к антителам других исследуемых вирусов представлены на рисунке 2. Определяется тенденция к развитию обратно пропорциональной зависимости между уровнем антител острой фазы к капсидному антигену к anti-EBV IgG-VCA и anti-EBV IgG-EBNA, однако данные статистически недостоверны. Имеется высокая корреляция между наличием ДНК вируса в опухоли и наличием ДНК других вирусов (CMV и HPV высокого онкогенного риска), умеренная зависимость между уровнем антител к ядерному белку и стадией процесса, и также наличием ДНК других вирусов в опухоли и их высоким уровнем антител, умеренная корреляция между белками ранней фазы и уровнем антител к капсидному антигену, что, по всей видимости, и определяет возникновение онкологического процесса.

Ряд данных статистически недостоверен из-за небольшого количества больных, включенных в исследование, и неравномерности их распределения по группам.

ОБСУЖДЕНИЕ

Вирус Эпштейна–Барр выделен в 1964 году из биоптатов пациентов с лимфомой Беркита (ЛБ) английским вирусологом М. Epstein и канадским вирусологом I. Barr. ВЭБ является представителем онкогенных ДНК-содержащих вирусов, его капсид диаметром

120-150 нм окружен оболочкой, содержащий липиды. В процессе репликации вируса экспрессируется свыше 70 различных вирусспецифических белков, однако к настоящему времени выделены группы иммуногенных белков, определение антител к которым дает возможность дифференцировать стадию инфекции: EA (early antigen) – ранний антиген – включает белки p54, p138; EBNA-1 (Epstein–Barr nuclear antigen) – ядерный антиген, белок p72; VCA (Viral capsid antigen) – капсидный антиген, включает комплекс белков p150, p18, p23; к настоящему времени показано, что иммунодоминантными белками в этом комплексе являются p18 и p23; LMP (Latent membrane protein) – латентный мембранный белок gp 125 [2, 9].

ВЭБ обладает выраженным тропизмом к В-лимфоцитам, где происходит его размножение, Т-клеткам и лимфоидным образованиям. Механизм действия ВЭБ заключается в том, что белок LMP-1, входящий в состав вируса, не только блокирует апоптоз (смерть клеток), но и помогает патогенным клеткам расти, размножаться и даже мигрировать. На молекулярном уровне больные клетки не подвергаются апоптозу, вследствие чего и развивается рак. Одна из мишеней, которую активизирует вирусный белок — рецептор эпидермального фактора роста (EGFR). Этот рецептор оказывает на клетку такое же воздействие, как и вирусный протеин LMP-1. То есть ВЭБ

провоцирует и поддерживает онкогенез в организме жертвы двусторонне – посредством своего белка LMP-1 и клеточного белка EGFR [9, 14 -16]. Если EGFR благодаря своим функциям запускает онкогенез, то LMP-1 (помимо вышеуказанных функций) блокирует клетки иммунной системы и поддерживает ангиогенез (формирование и рост новых сосудов), создавая благоприятные условия для роста и развития опухоли. Установлено, что в сыворотке крови пациентов с вирусным раком присутствует повышенное количество экзосом (в здоровых тканях переносят питательные вещества и мРНК) с вирусным белком и рецептором эпидермального фактора роста. Биологи нашли несколько «конечных станций» экзосом. Ими оказались клетки эпителия, эндотелий и фибробласты. Содержимое экзосом (вирусный белок и рецептор) стимулировало рост и размножение сосудов раковой опухоли, фактически запуская онкогенез [9, 14, 15, 16]. Было доказано, что экзосомы переносят еще и вирусную РНК, то есть заражают здоровую клетку. Причем инфицирование (а, значит, и последующее развитие опухоли) может происходить на достаточном удалении от самого очага инфекции. Многочисленные исследования доказывают, что в процессе хронической персистенции в эпителии и клетках иммунной системы ВЭБ самостоятельно может реализовывать механизмы иммуносупрессии, не позволяющие иммунной системе взять под контроль инфекционный процесс, им же индуцированный или вызываемый присутствующей посторонней микрофлорой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Высокий уровень антител к ядерному белку ВЭБ свидетельствует о высокой частоте реактивации вирусной инфекции у этой категории больных, причем у больных с рецидивным течением, высоким потенциалом злокачественности и местно-распространенным процессом реактивация происходит чаще, чем у больных с первичной опухолью низкого потенциала злокаче-



Рис. 2. Корреляционные закономерности уровня антител к ВЭБ

ственности и неинвазивным раком мочевого пузыря. У больных с высокодифференцированными опухолями и изначально местно-распространенным раком изменяется уровень антител к капсидному белку (anti-EBV IgG-VCA). У наиболее тяжелой категории больных с опухолями высокого потенциала злокачественности, распространенным процессом, высокой частотой рецидивирования имело место повышение уровня белков ранней фазы (anti-EBV Ig-EA). Титр различных антител коррелировал с повышенным уровнем антител других вирусов, наличием вируса и других вирусов в опухоли, стадией процесса. Остальные данные статистически недостоверны. Таким образом, все возрастающая роль вирусных инфекций в этиологии опухолей различной локализации, их влияние на частоту рецидивирования и течение заболевания диктует необходимость более

тщательного изучения их роли в этиологии развития рака мочевого пузыря.

ВЫВОДЫ

1. Выявлены высокие титры anti – EBV IgG-EBNA у больных раком мочевого пузыря. Их уровень был значительно выше у больных с рецидивным характером опухоли. Имеет место тенденция к увеличению уровня anti-EBV IgG – EBNA в зависимости от стадии процесса и степени анаплазии .
2. Значительного изменения уровня anti – EBV IgM-VCA не выявлено, в то же время IgG к капсидному антигену были резко повышены, при этом уровень антител при первичном поражении и высокодифференцированных опухолях был несколько выше, чем при рецидивных и низкодифференцированных. Данные статистически недостоверны из-за неравномерного

распределения их в группах.

3. Значительное повышение IgG к раннему антигену свидетельствует о неблагоприятном течении заболевания (высокая степень злокачественности, быстрое наступление рецидива, распространенность процесса).
4. Имеется высокая зависимость между наличием ДНК ВЭБ в опухоли и наличием ДНК других вирусов (CMV и HPV высокого онкогенного риска), умеренная зависимость между уровнем антител к ядерному белку и стадией процесса, и также наличием ДНК других вирусов в опухоли и их высоким уровнем антител и умеренная зависимость между белками ранней фазы и уровнем антител к капсидному антигену.
5. Полученные данные позволяют говорить о целесообразности продолжения исследования и получении статистически достоверных данных. ■

Резюме:

Проведено обследование и лечение 54 больных (44 мужчины и 10 женщин) в возрасте от 38 до 90 лет (средний возраст 64,6±9,93), поступивших в урологические отделения в экстренном порядке в связи с макрогематурией. Всем пациентам выполнено стандартное обследование и дополнительно иммуноферментный анализ крови на IgG, М к герпесу (HSV) I и II типа, цитомегаловирусу (CMV), вирусу Эпштейна-Барр (EBV), ПЦР мочи и опухоли к вышеуказанным вирусам, соскоб из уретры на выявление вируса папилломы человека (HPV) высокого онкогенного риска. Стадия процесса соответствовала T1NxM0 в 63% случаев (у 34 больных), T2N0M0 – у 12 больных (22,2%) и в 8 случаях имел место местно-распространенный процесс. Множественные опухоли мочевого пузыря выявлены у 28 больных. При патоморфологическом исследовании уротелиальный рак высокой степени злокачественности выявлен в 68,5% случаев (у 37 больных), у 12 больных рак с низким потенциалом злокачественности. Опухоль была рецидивная у 15 пациентов. У больных с рецидивным течением, высоким потенциалом злокачественности и местно-распространенным процессом уровень антител к ядерному белку ВЭБ (anti-EBV Ig-EBNA) был выше, чем у больных с неинвазивным первичным раком мочевого пузыря низкого потенциала злокачественности. У больных с высокодифференцированными опухолями и изначально местно-распространенным раком повышается уровень антител к капсидному белку (anti-EBV IgG-VCA). У больных с опухолями высокого потенциала злокачественности, распространенным процессом, высокой частотой рецидивирования имело место повышение уровня белков ранней фазы (anti-EBV Ig-EA). Титр различных антител коррелировал с повышенным уровнем антител других вирусов, наличием вируса и других вирусов в опухоли, стадией процесса.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, вирус Эпштейна-Барр, антитела к ядерному белку, антитела к капсидному белку, ранний белок.

Key words: bladder cancer, Epstein-Barr virus, antibodies to Epstein-Barr virus nuclear antigen, Epstein – Barr Virus antibody to viral capsid antigen, early protein.

ЛИТЕРАТУРА

1. Takada K. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. // Mol Pathol. 2000. Vol. 53, N 5. P. 255-261
2. Исаков В.А., Архипова Е.И., Исаков Д.В. Герпесвирусные инфекции человека. Руководство для врачей. СПб.: СпецЛит, 2006. 303 с.
3. Abe T, Shinohara N, Tada M, Harabayashi T, Sawaza A, Maruyama S, Moriuchi T, Takada K, Nonomura K. Infiltration of Epstein-Barr virus-harboring lymphocytes occurs in a large subset of bladder cancers. // Int J Urol. 2008. Vol. 15, N 5. P. 429-434.
4. Chuang KL, Pang ST, Liao SK, Wu CT, Chang YH, Chuang HC, Chuang CK. Epstein-Barr virus DNA load in tumor tissues correlates with poor differentiation status in non-muscle invasive urothelial carcinomas. // BJU Int. 2011. Vol. 107, N 1. P. 150-154.
5. Инфекционные болезни у детей. Под ред. Д. Марри. [Пер. с англ. под ред. Н. А. Федоровой]. М.: Практика, 2006. 928 с.
6. Казмирчук В.Е., Мальцев Д.В. Клиника, диагностика и лечение герпесвирусных инфекций человека. К.: Феникс, 2009. 248 с.
7. Марков И.С. Диагностика и лечение герпетических инфекций и токсоплазмоза: Сб. ст. К.: АртЭк, 2002. 192 с.
8. Janeway ChA., Travers JrP., Walport M., Shlomchik MJ. Immunobiology. 6th ed. Garland Science Publishing: New York — London, 2005.
9. Осипова Л.С. Особенности течения и лечения инфекции, вызванной вирусом Эпштейна – Барр. // Новости медицины и фармации. 2011. N 18(387).
10. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология. К.: Полиграф плюс, 2006. 482 с.
11. Кондраченко И.В., Блогов А.А. Первичные иммунодефициты. М.: Полиграф плюс, 2006. 482 с.
12. Крамарев С.А., Литвиненко Н.Г., Палатная Л.А. Эпштейна – Барр вирусная инфекция у детей. // Современная педиатрия. 2004. N 5. С. 13-18.
13. Малашенкова И.К., Дидковский Н.А., Сарсания Ж.Ш., Жарова М. А., Литвиненко Е. Н., Шепеткова И. Н., Чистова Л. И., Плчужкина О. В., Гусева Т. С., Паршина О. В. Клинические формы хронической Эпштейна – Барр вирусной инфекции: вопросы диагностики и лечения. // Лечащий врач. 2003. N 9. С. 32-38.
14. Cohen J.I. Epstein – Barr virus infection. // N Engl J Med. 2000. Vol. 343. P. 481-492.
15. Никольский И.С., Юрченко В.Д., Никольська К.І. Асоційований з активною хронічною Епштейна – Барр інфекцією клініко-імунологічний синдром. // Сучасні інфекції. 2003. N 3. С. 60-62.
16. Симовьян Э.Н., Денискова В.Б., Бовтало Л.Ф., Григорян А.В. Эпштейна-Барр вирусная инфекция у детей: современные подходы к диагностике и лечению. // Лечащий врач. 2007. N 7. С.36-41