

ВЫЯВЛЕНИЕ АУТОРЕАКТИВНЫХ АНТИТЕЛ КЛАССА М У ПАЦИЕНТОВ С РЕСПИРАТОРНЫМИ ВИРУСНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ

Кривицкая В.З.¹, Сверлова М.В.¹, Суховецкая В.Ф.¹,
Львов Н.И.², Васильева И.А.¹, Соминина А.А.¹

¹ ГУ Научно-исследовательский институт гриппа РАМН, Санкт-Петербург

² Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

Резюме. Цель исследования состояла в выявлении особенностей формирования аутореактивных IgM, взаимодействующих с молекулами IgG и антигенами нормальных клеток человека, в сыворотках крови пациентов с острыми респираторными вирусными инфекциями различной этиологии в зависимости от возраста и клинической картины заболевания. Содержание антител определяли иммуноферментным методом в парных сыворотках от 750 пациентов и одиночных материалах от 97 здоровых людей. Результаты анализа показали, что исследованные типы аутореактивных IgM являются нормальной составляющей гуморального иммунитета, поскольку присутствуют в значительном количестве в сыворотках более чем у половины здоровых людей старше 3 лет. При острых респираторных вирусных инфекциях различной этиологии у детей в возрасте до 3 лет частота сопутствующих сероконверсий аутореактивных IgM составила 0-16%. У детей более старшего возраста и взрослых пациентов с респираторно-синцитиальной вирусной или аденовирусной инфекцией частота сероконверсий достигала 37% и была в 1,7-5,1 раз выше, чем при гриппе А, гриппе В или парагриппе. При осложненном течении заболеваний респираторно-синцитиальной вирусной или аденовирусной этиологии (обструкция респираторного тракта или пневмония) частота сероконверсий аутореактивных IgM была в 1,4-1,8 раз выше, чем у больных с неосложненным течением этих инфекций.

Ключевые слова: аутореактивные IgM, острые респираторные вирусные инфекции, дети, взрослые.

Krivitskaya V.Z., Sverlova M.V., Sukhovetskaya V.F., Lvov N.I., Vassilieva I.A., Sominina A.A.

DETECTION OF AUTOREACTIVE CLASS M ANTIBODIES IN PATIENTS WITH RESPIRATORY VIRAL INFECTIONS

Abstract. The aim of this study was to detect some features of autoreactive IgM production that interact with IgGs and normal human cellular antigens in blood sera of patients with acute respiratory viral infections caused by various factors, dependent on their age and clinical features of disease. The antibody concentrations were determined by immunoenzyme technique in paired serum samples from 750 patients and single specimens from 97 healthy persons. The results of analysis have shown that the studied types of autoreactive IgM represent a normal component of humoral immunity, since they are detectable in sufficient number of normal sera from healthy persons over 3 years old. In acute respiratory viral infections of different etiology, the rates of appropriate seroconversions comprised 0 to 16% for age cohort of < 3 years old. Incidence of seroconversions reached 37% among older children and adult patients with respiratory syncytial virus (RSV), or adenoviral infection, thus being 1.7 to 5.1-fold higher than in patients with influenza A, or B, or parainfluenza. In cases of clinical

complications of RSV or parainfluenza infections (i.e., respiratory tract obstruction, or pneumonia), the rates of seroconversions to autoreactive IgMs was 1.4 to 1.8-fold higher than among the patients with uncomplicated clinical course of these infections. (*Med. Immunol., 2008, vol. 10, N 2-3, pp 229-238*)

Адрес для переписки:

Кривицкая Вера Зорьевна
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 15/17,
НИИ гриппа РАМН.
Тел./факс: (812) 346-12-70.
E-mail: vera.kriv@influenza.spb.ru

В настоящее время наблюдается возрастающий интерес к изучению аутоиммунных процессов, наблюдаемых при физиологических условиях, а также при различных заболеваниях, не связанных с системными аутоиммунными нарушениями, включая вирусные инфекции [14, 16]. У здоровых людей аутоиммунной реактивностью обладают «нормальные» (natural) антитела (АТ), относящиеся главным образом к классу М. В отличие от высокоаффинных антигенспецифичных АТ, синтезирующихся под воздействием чужеродных агентов в результате адаптивных иммунных реакций, нормальные АТ являются составной частью врожденного иммунитета, не претерпевают соматических мутаций и узнают не отдельные структурные эпитопы антигенов (АГ), а эволюционно консервативные шаблоны (patterns), чем и объясняются их основные свойства — низкий аффинитет, полиспецифичность и аутореактивность. Аутореактивные нормальные АТ являются необходимой составляющей иммунологического гомеостаза и не связаны в норме с развитием аутоиммунных заболеваний. Эти АТ выполняют у млекопитающих функцию первой линии иммунологической защиты (до начала синтеза адаптивных АТ), взаимодействуя с консервативными детерминантами патогенов, структурно сходными с хозяйскими АГ [5]. Аутореактивные IgM (ауто-IgM) взаимодействуют с ауто-АГ клеток, целостность которых нарушена вследствие апоптоза и/или некроза. Образующиеся при этом иммунные комплексы (ИК) поглощаются макрофагами значительно эффективнее, чем свободные АГ [7].

Различные вирусы могут индуцировать аутоиммунные реакции, однако до сих пор нет полной картины в понимании механизмов этих процессов. Известно, что при краснухе, цитомегаловирусной и ВИЧ-инфекциях повышено содержание в крови ревматоидного фактора — ауто-IgM, взаимодействующих с эпитопами константного региона (Fc) молекулы IgG [9]. При этом синтез и роль ауто-АТ при острых респираторных вирусных инфекциях не изучены.

Цель исследования состояла в выявлении особенностей формирования аутореактивных IgM, взаимодействующих с молекулами IgG и антигенами нормальных клеток человека, в сыворотках крови пациентов с острыми респираторными вирусными инфекциями (ОРВИ) различной этиологии в зависимости от возраста и клинической картины заболевания.

Материалы и методы

Клинические материалы. Проанализированы парные сыворотки, полученные от 750 больных с ОРВИ, протекающими в неосложненной форме или с осложнениями в виде обструкции респираторного тракта или острой пневмонии. Пациенты

(дети, госпитализированные в детскую больницу № 4, а также взрослые, находившиеся на лечении в клинике инфекционных болезней ВМедА им. С.М. Кирова и городской инфекционной больницы № 30) были разделены на следующие возрастные группы: от 11 месяцев до 3 лет (I группа); с 3 (включительно) до 7 лет (II группа); с 7 до 12 лет (III группа); с 12 до 16 лет (IV группа), а также взрослые пациенты старше 16 лет (средний возраст $28,0 \pm 10,5$ лет). Соответственно, численность групп составила 187, 164, 126, 65 детей и 208 взрослых пациентов. Парные сыворотки были получены в острой фазе (на 2-4 дни заболевания) и в период реконвалесценции (через 7-14 дней после начала заболевания). Помимо материалов, полученных от больных с ОРВИ, были проанализированы одиночные сыворотки от 50 клинически здоровых детей в возрасте от 3 до 16 лет, разделенных на возрастные группы (II-IV), аналогично пациентам с ОРВИ, а также от 47 взрослых доноров (средний возраст $20,6 \pm 2,1$ лет).

Диагностирование вирусных инфекций. Диагноз респираторно-синцитиальной вирусной инфекции (РСВИ), гриппа и аденовирусной инфекции (АВИ) ставили по результатам выявления сероконверсий специфических противовирусных IgG в ИФА (возрастание содержания АТ в сыворотках в стадии реконвалесценции по сравнению с острым периодом заболевания). При проведении ИФА для сенсibilизации планшет использовали вирусы, очищенные ультрацентрифугированием в градиенте плотности сахарозы. Процедура проведения используемой модификации анализа описана ранее [1]. Парогриппозную инфекцию диагностировали выявлением сероконверсий противовирусных АТ в реакции торможения гемагглютинации [3].

Выявление в непрямом ИФА ауто-IgM, взаимодействующих с молекулами IgG человека (анти-IgG-IgM). В качестве антигена для сенсibilизации твердой фазы использовали очищенный донорский IgG (Предприятие НИИ им. Пастера, Санкт-Петербург). В лунки планшет вносили по 100 мкл антигена (2 мкг/мл IgG), разведенного карбонатно-бикарбонатным буфером (КББ), pH 9,5, и инкубировали в течение 18 ч при 4°C. После 3-кратной отмывки планшет 0,01 М фосфатно-солевым буфером (ФСБ), pH 7,2, с добавлением 0,05% твина-20 (ФСБ-Т) в лунки вносили по 100 мкл исследуемых сывороток, разведенных до 1/400 в ФСБ-Т с добавлением 0,5% желатины (ФСБ-Т-Ж), и инкубировали в течение 18 ч при 4°C. После отмывки планшет ФСБ-Т детекцию анти-IgG-IgM в сыворотках проводили инкубацией (в течение 1 ч при 37°C) с пероксидазным конъюгатом моноклональных антител (МКА) М/2В9 к μ -цепи IgM человека (НПО «Полигност», Санкт-Петербург), разведенного 1/100 в ФСБ-Т-Ж. После 3-кратной отмывки планшет

ФСБ-Т пероксидазную реакцию проявляли добавлением субстратной смеси, содержащей 0,02% H_2O_2 и 0,1 мг/мл 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ). Результаты учитывали спектрофотометрически при длине волны 450 нм (OD_{450}).

Выявление в непрямом ИФА ауто-IgM, взаимодействующих с антигенами нормальных клеток (анти-NCaG-IgM). В качестве антигенной смеси использовали фракцию солиubilизированных поверхностных структур, полученных из клеток культуры фибробластов легкого эмбриона человека (ФЛЭЧ). Для приготовления антигенов нормальных клеток (NCaG) суспензию клеток ФЛЭЧ обрабатывали 2% β -октилгликозидом («Sigma», США) в течение 1 ч при 37°C с последующим центрифугированием при 10 000 об/мин для осаждения клеточного дебриса и ядер. Супернатант, разведенный КББ до концентрации 2 мкг/мл, использовали для сенсibilизации планшет (18 ч при 4°C). После 3-кратной отмывки планшет ФСБ-Т вносили исследуемые сыворотки (100 мкл/лунку в разведении 1/400 на ФСБ-Т-Ж) и инкубировали в течение 18 ч при 4°C. Детекцию анти-NCaG-IgM в сыворотках с использованием меченных пероксидазой МКА М/2В9 к μ -цепи IgM человека и проявление пероксидазной реакции проводили, как указано выше.

Учет результатов выявления ауто-IgM в сыворотках крови. Разведения сывороток, используемых в ИФА, были подобраны в предварительных экспериментах таким образом, чтобы получаемые значения OD_{450} находились в области прямо пропорциональной зависимости от содержания АТ в сыворотках. У больных ОРВИ сероконверсии анти-IgG-IgM и анти-NCaG-IgM считали доказанными, если величина OD_{450} для сыворотки, полученной в реконвалесцентный период, превышала не менее чем на 0,3 показатель OD_{450} для сыворотки, взятой у того же пациента в острой фазе заболевания. Содержание ауто-IgM в индивидуальных сыворотках (показателем которого является величина OD_{450}) соотносили с показателями, полученными в ИФА для группы сравнения (OD_{450} Кср.). Содержание ауто-IgM в исследуемых сыворотках считали низким или высоким, если OD_{450} в них превышали OD_{450} Кср. не более чем в 1,5 раза ($\leq 1,5 OD_{450}$ Кср.) или не менее чем в 3 раза ($\geq 3 OD_{450}$ Кср.), соответственно.

Детекцию IgM, специфичных к респираторно-синцициальному вирусу (РСВ), у пациентов с РСВИ проводили в ИФА «с захватом АТ». Для сенсibilизации планшет (18 ч при 4°C) использовали МКА М/2В9 к μ -цепи IgM человека, разведенные в КББ до концентрации 4 мкг/мл (100 мкл/лунку). После 3-кратной отмывки планшет ФСБ-Т вносили исследуемые сыворотки, разведенные 1/200 в ФСБ-Т, и инкубировали в течение 18 ч при 4°C. Затем в отмытые ФСБ-Т планшеты вносили РСВ (4 мкг/мл, 100 мкл/лунку), очищенный ультра-

центрифугированием в градиенте плотности сахарозы. После инкубации в течение 2 ч при 37°C и отмывки планшет ФСБ-Т проводили детекцию связанного с IgM вируса с помощью пероксидазного конъюгата МКА 9С5 к поверхностному F-белку РСВ (инкубация 2 ч при 37°C при разведении конъюгата 1/2000 в ФСБ-Т) с последующим отмыванием ФСБ-Т и добавлением субстратной смеси, содержащей 0,02% H_2O_2 и 0,1 мг/мл ТМБ. Результаты учитывали при длине волны 450 нм (OD_{450}). Положительными по содержанию анти-РСВ-IgM считали сыворотки, OD_{450} которых превышали в два и более раз показатель контрольной группы (средняя арифметическая OD_{450} сывороток от 10 здоровых людей, взятых в том же разведении). Сероконверсии считали доказанными при различии показателей OD_{450} в парных сыворотках не менее 0,3.

Выявление IgE, специфичных к РСВ, в крови пациентов с РСВИ проводили в ИФА, как описано ранее [1, 2]. Для сенсibilизации планшет в качестве антигена использовали РСВ, очищенный ультрацентрифугированием в градиенте плотности сахарозы. Анализ проводили при разведении сывороток 1/10. Для детекции РСВ-специфичных IgE в сыворотках использовали МКА 8Е/4F4 к ϵ -цепи IgE человека, меченные пероксидазой (НПО «Полигност», Санкт-Петербург). Положительными по содержанию анти-РСВ-IgE считали сыворотки, OD_{450} которых превышали в два и более раз контрольный показатель (средняя арифметическая OD_{450} сывороток от 10 здоровых людей, взятых в разведении 1/10).

Статистическая обработка результатов проведена с применением программы StatXact-7.0 (Cytel Software Corporation). Среднегрупповой уровень ауто-IgM в сыворотках выражали в виде средней арифметической $OD_{450} \pm$ стандартное отклонение. Статистическую значимость отличий между показателями OD_{450} в сыворотках, взятых в разные сроки заболевания, оценивали с применением рангового критерия знаков Вилкоксона. Мерой корреляции между качественными признаками (связь между наличием сероконверсий различных типов АТ) при анализе таблиц сопряженности служила каппа Коэна. Сравнение выборочных долей (частот выявления сероконверсий ауто-IgM в различных группах пациентов) проводили с использованием точного критерия Фишера с поправкой на множественность анализа.

Результаты

Особенности аутоиммунных реакций у пациентов с ОРВИ в зависимости от этиологии заболевания и возраста пациентов

В результате лабораторных исследований РСВИ, АВИ, парагрипп, грипп А и грипп В были выявлены у 222, 83, 46, 128 и 43 пациентов, со-

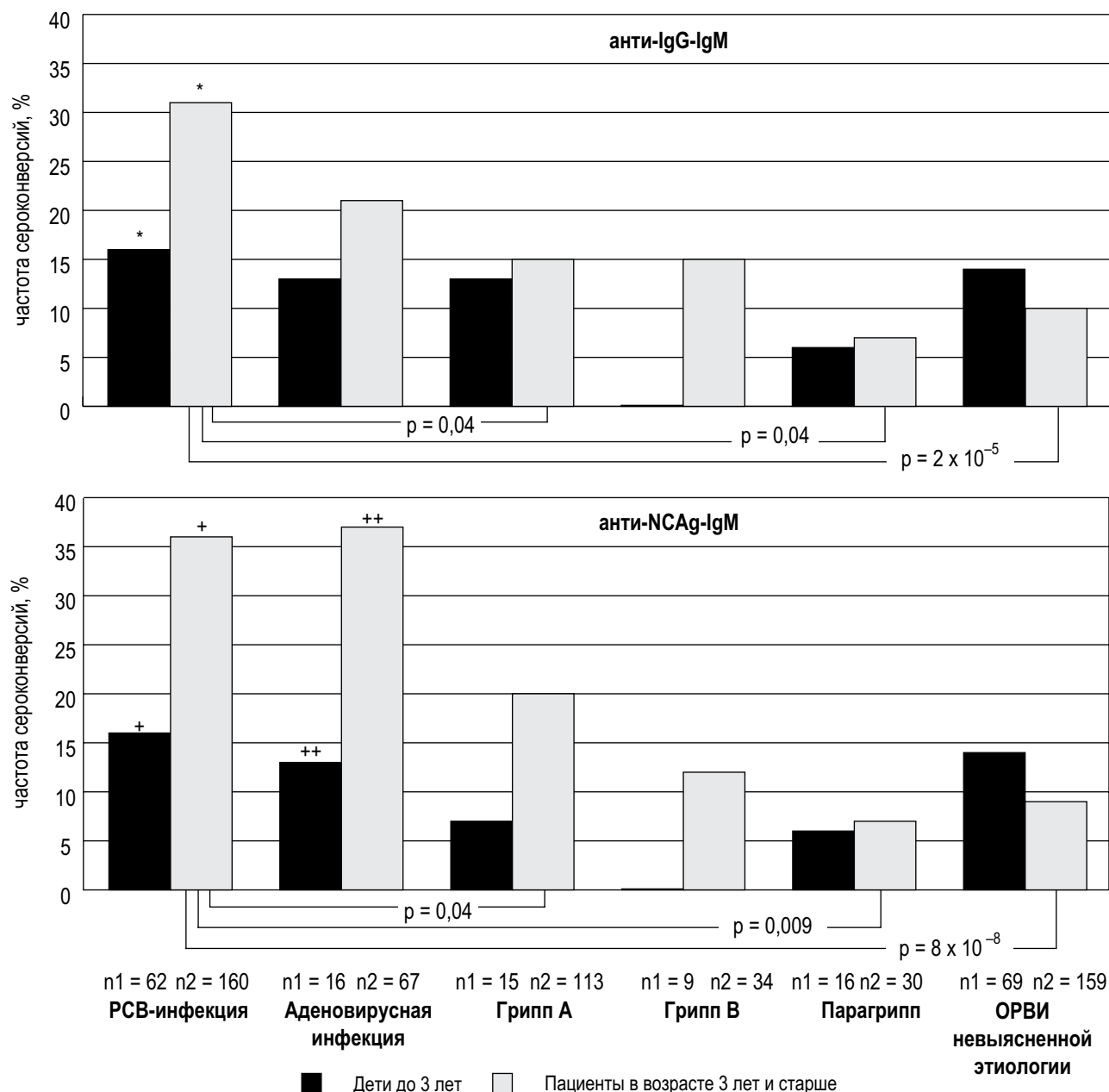


Рисунок 1. Частота сероконверсий аутореактивных IgM у больных с респираторными вирусными инфекциями в зависимости от возраста

Примечания: n1, n2 – численность групп детей в возрасте до 3 лет и пациентов > 3 лет, соответственно; у пациентов > 3 лет с АВИ отличия были статистически значимы для анти-NCAg-IgM: АВИ/грипп В ($p = 0,041$), АВИ/парагрипп ($p = 0,0075$), АВИ/ОРВИ невыясненной этиологии ($p = 5 \times 10^{-5}$); отличия между возрастными группами пациентов: * – $p = 0,028$, + – $p = 0,0029$, ** – $p = 0,037$.

ответственно. У 228 больных этиология ОРВИ осталась невыясненной. Был проведен анализ частоты сероконверсий ауто-IgM в зависимости от этиологии ОРВИ и возраста пациентов.

Установлено, что при разных вирусных инфекциях у детей I возрастной группы (от 11 месяцев до 3 лет) частота сероконверсий ауто-IgM к молекуле IgG и NCAg была невысокой (0-16%).

У детей II-IV возрастных групп и взрослых пациентов не было выявлено межгрупповых отличий по частоте сопутствующего ОРВИ формиро-

вания ауто-IgM, что позволило при последующем анализе объединить их в одну группу (> 3 лет). Показано, что при РСВИ и АВИ у пациентов в возрасте > 3 лет частота регистрации конверсий аутореактивных IgM (особенно анти-NCAg-IgM) была выше в 1,4-5,3 раз, чем при ОРВИ иной этиологии. Кроме того, у больных с РСВИ и АВИ, в отличие от пациентов с другими вирусными инфекциями, были выявлены статистически значимые отличия от детей младшего возраста – сероконверсии ауто-IgM обоих типов регистрировали

в 1,6-2,8 раз чаще в группе > 3 лет, чем у детей I группы (рис. 1).

Особенности реакции ауто-IgM в зависимости от формы патологии

Особый интерес представляло определение связи между тяжестью клинического течения респираторной инфекции и интенсивностью формирования аутореактивных АТ. У детей в возрасте до 3 лет не было установлено такой зависимости ни при одном из анализируемых заболеваний.

В группе > 3 лет при заболеваниях РСВ и аденовирусной этиологии, протекающих в осложненной форме (обструкция респираторного тракта или пневмония), частота сероконверсий ауто-IgM была в 1,4-1,8 раз выше, чем у больных с неосложненным течением этих инфекций. Эти отличия для анти-NCAg-IgM были статистически значимы. При гриппе А и ОРВИ невыясненной этиологии реакция ауто-IgM не зависела от степени тяжести заболевания (рис. 2).

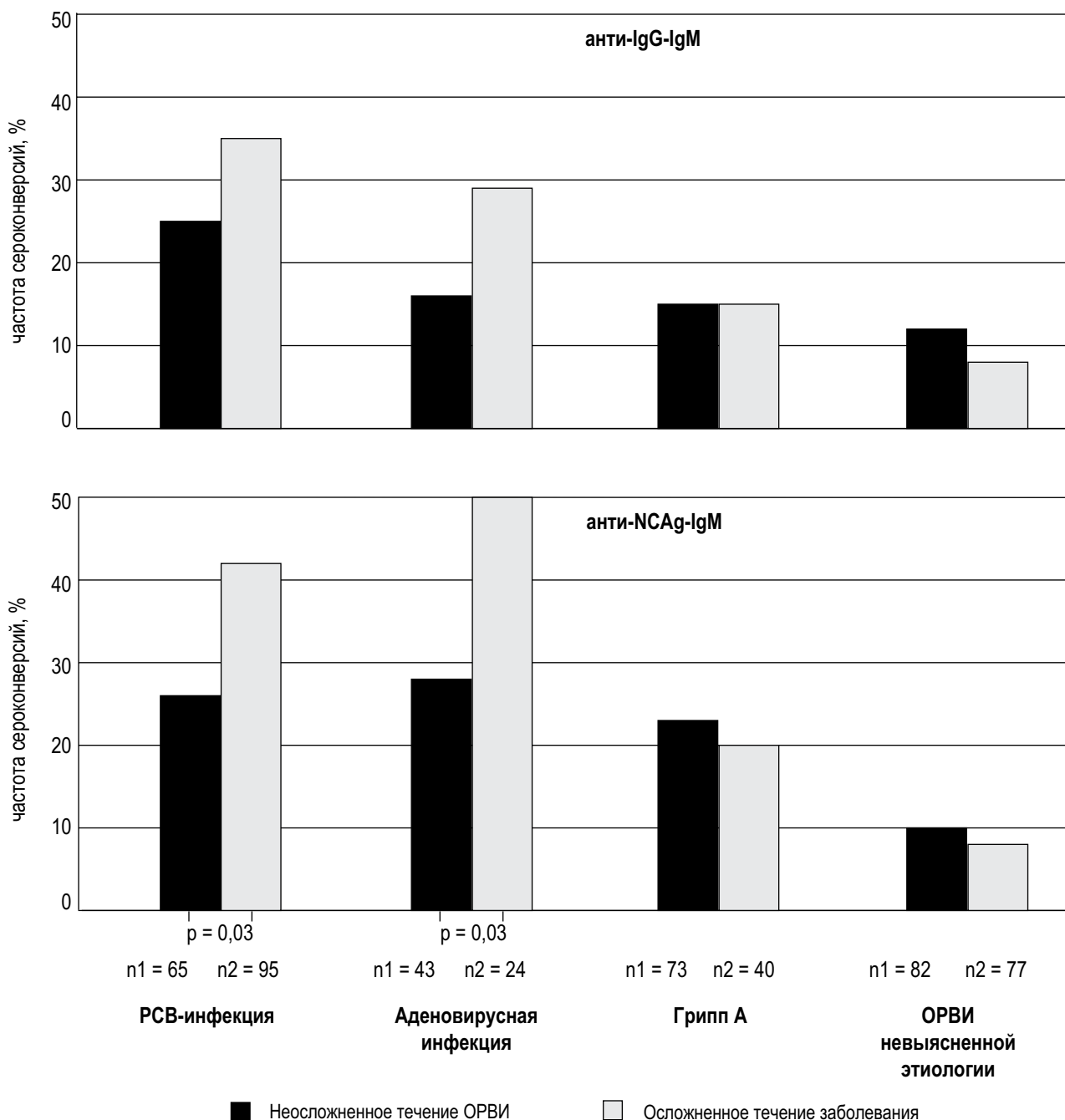


Рисунок 2. Частота сероконверсий аутореактивных IgM при респираторных вирусных инфекциях у пациентов в возрасте трех лет и старше в зависимости от тяжести заболевания

Примечание. n1, n2 – численность групп с неосложненным и осложненным течением заболевания, соответственно.

Корреляционный анализ совокупных данных по всем возрастным группам больных с ОРВИ показал наличие связи между наличием конверсий анти-IgG-IgM и анти-NCAg-IgM: каппа Коэна составила 0,43 ($p = 0,0005$). У пациентов с выявленными сероконверсиями ауто-IgM синхронное увеличение уровня обоих типов АТ в крови наблюдали в 59-61% случаев.

Длительность выявления аутореактивных IgM в крови пациентов с осложненным течением ОРВИ

Длительность сохранения ауто-IgM в крови после перенесенной респираторной инфекции была прослежена на ограниченной группе больных — у взрослых пациентов с РСВИ и АВИ, осложненными пневмонией (18 и 12 человек, соответственно), сроки госпитализации которых достигали 3-4 недель. При РСВИ уровень ауто-IgM после подъема, наблюдаемого на 7-14 дни заболевания, не снижался в течение всего времени наблюдения (до 20 дня). Более того, у большинства (67%) пациентов было показано дальнейшее повышение уровня ауто-IgM в этот

период. Вместе с тем, после перенесенной АВИ уровень ауто-АТ снижался до исходного через 16-20 дней (рис. 3).

Особенности аутоиммунных реакций у пациентов с РСВИ

Поскольку полученные нами результаты свидетельствовали о том, что ауто-IgM чаще образуются при РСВИ, в этой группе пациентов были изучены связи между образованием противовирусных и аутореактивных АТ. Корреляции между синтезом ауто-IgM и РСВ-специфичных IgM в ходе заболевания выявлено не было. Значения каппы Коэна варьировали в пределах 0,01-0,24 ($p > 0,05$) у пациентов разного возраста и при различном клиническом течении инфекции. Кроме того, формирование анти-РСВ-IgM наблюдали чаще ($p < 0,001$), чем аутореактивных IgM. В острый период РСВИ РСВ-специфичные IgM в сыворотках детей из I и II-IV возрастных групп были выявлены в 70% и 73% случаев, что превышало частоту детекции сероконверсий ауто-IgM

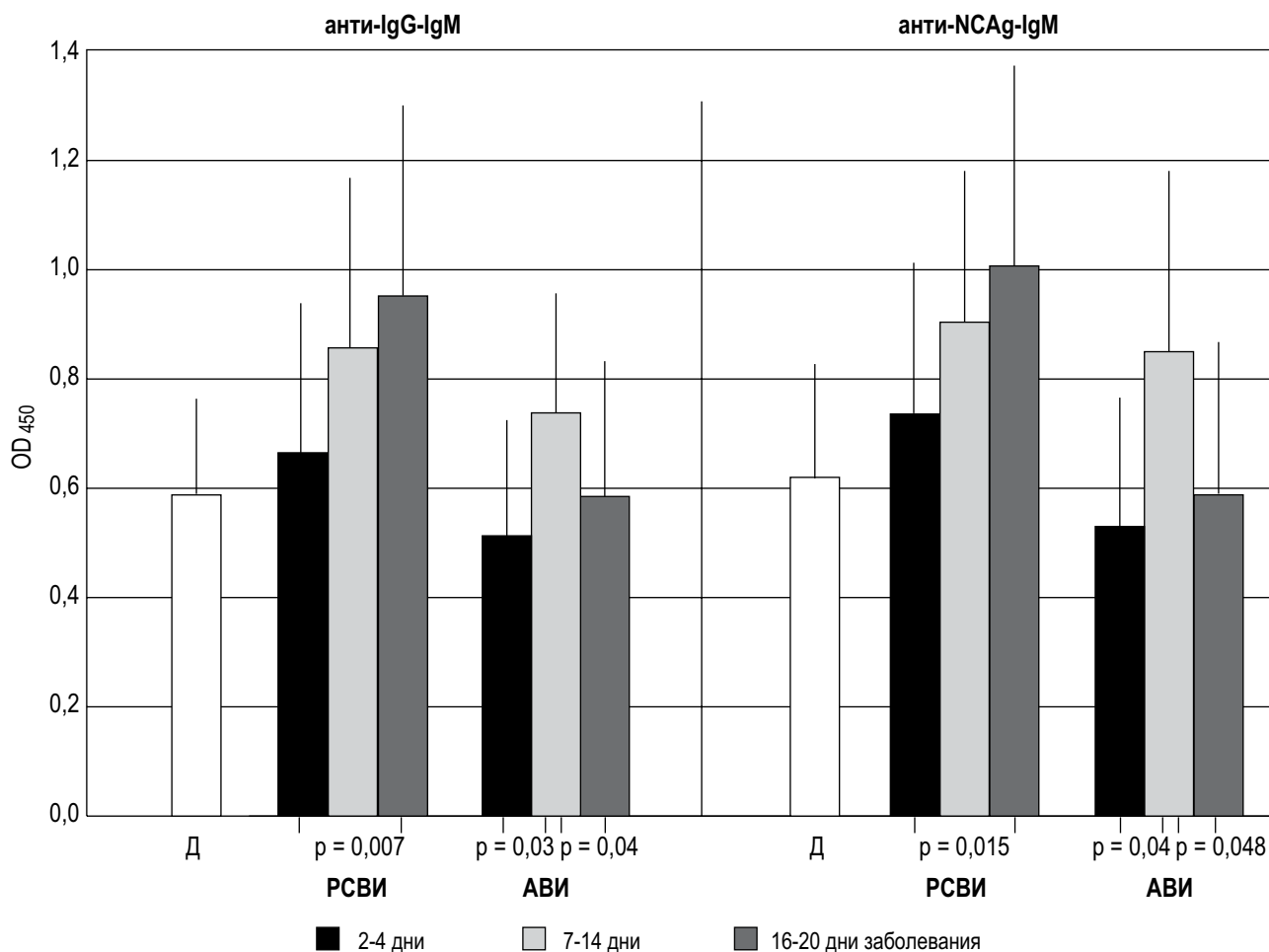


Рисунок 3. Динамика формирования аутореактивных IgM у взрослых больных с осложненным течением респираторно-синцитиальной вирусной или аденовирусной инфекции

Примечание. Д – уровень ауто-IgM в сыворотках взрослых доноров ($n = 47$).

в 4,4 и 2,2, соответственно. Конверсии анти-PCB-IgM регистрировали у 50% взрослых пациентов — в 1,8 раз чаще, чем ауто-IgM.

Не было выявлено связи между образованием ауто-IgM и анти-PCB-IgE, которые являются показателем IgE-зависимой аллергии на вирусные АГ.

Определение среднего возрастного уровня ауто-IgM в сыворотках

Определение содержания ауто-IgM в сыворотках крови клинически здоровых людей дает представление о среднем (фоновом) уровне «физиологической» аутореактивности, присущей данному возрасту и сформированной в результате воздействия на иммунную систему чужеродных и собственных АГ. Для характеристики этого показателя было проведено сопоставление с уровнем ауто-IgM в группе сравнения (Кср). Кср. представлял собой усредненный показатель OD_{450} , полученных для сывороток от 10 детей в возрасте от 2 до 7 месяцев, ничем ранее не болевших. Содержание ауто-IgM в этой группе было минимальным. OD_{450} Кср. составили $0,25 \pm 0,08$ и $0,22 \pm 0,06$ для анти-IgG-IgM и анти-NCaG-IgM, соответственно.

Не было выявлено статистически значимых межгрупповых отличий для уровня ауто-IgM у здоровых детей из II-IV возрастных групп и взрослых доноров. Среди здоровых детей, объединенных в одну группу старше 3 лет, а также взрослых доноров с большой частотой наблюдались случаи высокого содержания в крови (≥ 3 OD_{450} Кср.) как анти-IgM-IgG (52% и 40%), так и анти-NCaG-IgM (58% и 64%). При этом частота выявления сывороток с низким содержанием этих АТ ($\leq 1,5$ OD_{450} Кср.) была незначительной и варьировала в пределах 7-12%.

Поскольку взятие материала от здоровых детей младшего возраста (I группа) представляло определенные трудности, были исследованы сыворотки 97 пациентов с ОРВИ в возрасте от 11 месяцев до 3 лет, полученные в первые два дня заболевания. Ранние сроки забора крови (до развития активного гуморального иммунного ответа на инфекцию) позволили рассматривать полученные данные как равнозначные показателям до заболевания, т.е. соответствующие среднему «физиологическому» уровню ауто-IgM в данной возрастной группе. Правомерность этого допущения показывают наши данные о том, что независимо от этиологии заболевания у больных с ОРВИ старших возрастных групп, среднегрупповой уровень ауто-IgM (показатели OD_{450}) в первые дни заболевания не отличались от показателей, полученных для здоровых людей соответствующего возраста.

У детей I возрастной группы в первые дни ОРВИ частота выявления сывороток с высоким

содержанием анти-IgM-IgG и анти-NCaG-IgM составляла 20-25%, т.е. была в 1,6-2,6 раз ниже ($p < 0,001$), чем у здоровых людей старшего возраста. Низкий уровень ауто-IgM обоих типов, наоборот, регистрировали значительно чаще (в 39-47% случаев, $p < 0,001$), чем у здоровых детей старших возрастных групп и взрослых доноров. Таким образом, нормальный физиологический уровень анти-IgG-IgM и анти-NCaG-IgM в крови здоровых людей увеличивается с возрастом (после 3 лет).

Анализ сывороток, полученных от здоровых людей (детей и взрослых в совокупности), показал наличие связи между содержанием (OD_{450}) анти-IgG-IgM и анти-NCaG-IgM в крови — коэффициент корреляции составил 0,7 ($p = 0,0005$).

Обсуждение

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что аутореактивные АТ класса М к молекуле IgG и АГ неинфицированных клеток человека относятся к нормальным АТ, поскольку присутствуют в сыворотках крови клинически здоровых людей. Высокое содержание этих АТ выявлено в сыворотках более чем у половины здоровых детей старше 3 лет и взрослых доноров. У детей в возрасте до 3 лет нормальный «физиологический» уровень анти-IgG-IgM и анти-NCaG-IgM значительно ниже, чем у здоровых людей старших возрастных групп. В свете известных данных о защитных и регуляторных функциях, выполняемых аутореактивными нормальными IgM при воздействии на организм чужеродных АГ (в том числе вирусных), можно предположить, что формирование и поддержание оптимального (фонового) уровня анти-IgG-IgM и анти-NCaG-IgM у здоровых людей важно для иммунологической защиты, а низкое содержание этих АТ в крови может быть одной из причин повышенной чувствительности маленьких детей к вирусным инфекциям. Выявленные возрастные отличия можно объяснить «созреванием» иммунной системы вследствие ее постоянной стимуляции чужеродными и ауто-АГ. Несмотря на то, что синтез нормальных АТ является функцией врожденного иммунитета и их антигенная специфичность детерминирована уже при внутриутробном развитии, продуцирующие их аутореактивные В1-лимфоциты подвержены позитивной селекции. В связи с этим антигенная направленность и количество синтезируемых ими ауто-IgM может сильно варьировать в зависимости от спектра АГ, взаимодействующих с иммунной системой индивидуума в течение жизни [13].

При всех исследованных респираторных вирусных инфекциях (гриппе А и В, парагриппе, АВИ и РСВИ) у детей в возрасте от 11 месяцев до 3 лет содержание ауто-IgM существенно

не менялось в ходе заболевания, а частота сероконверсий не превышала 16%. При РСВИ и АВИ (но не гриппе и парагриппе) этот показатель увеличивался с возрастом (после 3 лет) и у пациентов старших возрастных групп был выше при осложненном течении заболевания, чем при неосложненном. Наблюдаемые отличия могут объясняться особенностями патогенеза РСВИ и АВИ.

В регуляции аутоиммунных процессов важную роль играет цитокиновая среда. Быстрый синтез аутореактивных нормальных IgM индуцируется не столько АГ-специфичными сигналами, сколько медиаторами воспаления, вызванного патогенами [5]. Важную роль в регуляции синтеза ауто-АТ играет IL-6, который также является одним из ключевых медиаторов воспаления при многих вирусных инфекциях. Для некоторых вирусных заболеваний показано, что увеличение уровня нормальных ауто-IgM ассоциировано прежде всего с повышенной активностью IL-6, индуцируемого вирусом [12]. Среди респираторных вирусов аденовирусы и в еще большей степени РСВ являются наиболее мощными стимуляторами синтеза IL-6 макрофагами и клетками бронхиального эпителия [4, 18]. Особенно сильная локальная активация IL-6 в легких показана при осложненном течении РСВИ [10] и АВИ [11]. Можно предположить, что наблюдаемую нами повышенную активность ауто-IgM при РСВИ и АВИ, особенно выраженную при осложненном течении заболеваний, обуславливают сходные механизмы регуляции воспалительных процессов при этих инфекциях и синтеза аутореактивных АТ (например, активация синтеза IL-6).

Наличие корреляции между содержанием анти-IgG-IgM и анти-NCAg-IgM у здоровых людей, а также большая частота выявления синхронных конверсий этих АТ у пациентов с респираторными вирусными инфекциями позволяет предположить, что выявляемые нами типы ауто-IgM обладают перекрестной активностью по отношению к молекуле IgG и клеточным АГ, т.е. являются полиреактивными, что характерно для нормальных IgM.

На примере РСВИ было показано отсутствие связи между синтезом аутореактивных и вирус-специфичных IgM, что свидетельствует о независимом синтезе этих двух типов АТ. Это согласуется с данными литературы о различных механизмах регуляции синтеза нормальных и адаптивных АГ-специфичных иммуноглобулинов [5].

В зависимости от характера вирусной инфекции и индивидуальных особенностей иммунной системы реакции на патоген со стороны как адаптивного, так и врожденного иммунитета могут играть двоякую роль — протективную и патологическую. Не исключается принципиальная возможность участия нормальных IgM в патологических механизмах, поскольку у здоровых людей

эти АТ взаимодействуют зачастую с теми же ауто-АГ, что и патогенные IgM при аутоиммунных заболеваниях [13]. При апоптозе и лизисе клеток (в том числе инфицированных вирусами) образуются модифицированные клеточные нео-АГ в результате экспонирования скрытых (cryptic) эпитопов и различных посттрансляционных модификаций мембранных компонентов. Массовая гибель клеток и высвобождение большого количества свободных ауто-АГ может вызвать сильное воспаление и повреждение здоровых тканей за счет локальной активации системы комплемента ИК, образованными аутореактивными нормальными IgM и нео-АГ [19]. Наблюдаемое нами увеличение уровня анти-IgG-IgM и анти-NCAg-IgM в динамике заболевания у больных с осложненным течением РСВИ и АВИ дает основание для предположения об участии этого типа АТ в воспалительных процессах, вызывающих развитие осложнений у людей старшего возраста (т.е. при наличии зрелой иммунной системы, обуславливающей быстрый эффективный синтез АТ, включая нормальные аутореактивные IgM), возможно, по описанному выше механизму. Наиболее обоснованным это предположение выглядит для пациентов с осложненным течением РСВИ, у которых, в отличие от больных АВИ, содержание ауто-IgM в крови возрастало на протяжении достаточно длительного времени.

Характерной особенностью РСВ является способность вызывать иммунопатологические явления в значительно большей степени, чем другие респираторные вирусы (вирусы гриппа и парагриппа, аденовирусы) [4, 8]. Например, РСВ индуцирует развитие аллергических процессов в респираторном тракте, которые способствуют формированию легочной обструкции и провоцируют развитие бронхиальной астмы [6, 10]. Ранее нами была установлена связь между развитием обструкции верхних и нижних дыхательных путей при РСВИ у детей как младшего, так и старшего возраста и содержанием в крови РСВ-специфичных IgE [2], синтез которых является показателем аллергии на вирусные АГ [6]. Поскольку известны данные о том, что аутоиммунная активность повышена у аллергиков [17], особый интерес представляло выявление связи между синтезом ауто-IgM и аллергическими проявлениями при ОРВИ. Отсутствие корреляции между формированием сероконверсий ауто-IgM и анти-РСВ-IgE, показанное в проведенном исследовании, свидетельствует о том, что синтез анти-IgG-IgM и анти-NCAg-IgM не связан с развитием IgE-зависимой аллергии на антигены РСВ. Однако это не исключает возможного участия ауто-IgM в других патологических механизмах в условиях сильного вирус-индуцированного воспаления, наблюдаемого при осложненном течении инфекции.

Следует особо отметить, что присутствие в крови нормальных ауто-IgM, предшествующих развитию противовирусных адаптивных реакций, и индукция сероконверсий этого типа АТ у пациентов с ОРВИ является причиной ложноположительных результатов (по нашим данным в 20-80% случаев в зависимости от возраста и формы респираторной патологии) при оценке уровня специфических противовирусных IgM в непрямом ИФА (когда для сенсibilизации планшет используют вирусные АГ с последующим внесением исследуемых сывороток и пероксидазного конъюгата АТ к IgM человека). Это объясняется тем, что анти-IgG-IgM взаимодействуют с молекулами вирусспецифического IgG, прореагировавшими на твердой фазе с вирусными АГ. Сывороточные анти-NCaAg-IgM могут связываться с ауто-АГ, поскольку различные клеточные компоненты включаются в состав вирионов в процессе их синтеза [15]. В результате оба типа аутореактивных IgM выявляются анти-IgM-конъюгатом наряду с вирусспецифическими IgM, что сильно искажает реальную картину противовирусного ответа. В связи с этим для детекции вирусспецифических IgM обязательным является использование ИФА «с захватом АТ», результаты которого не зависят от наличия ауто-IgM в анализируемых материалах, поскольку комплекс АГ-АТ выявляется специфическими противовирусными моноклональными АТ.

Заключение

Результаты проведенного исследования показали, что аутореактивные IgM, взаимодействующие с молекулой IgG и клеточными АГ человека, являются нормальной составляющей гуморального иммунитета. Содержание ауто-IgM в крови здоровых людей увеличивается с возрастом. Ауто-IgM активно синтезируются при острых респираторных вирусных заболеваниях, особенно при осложненном течении респираторно-синцитиальной и аденовирусной инфекций.

Список литературы

1. Кривицкая В.З., Сироткин А.К., Самойлович М.П., Соминина А.А. Разработка новых подходов к стандартизации иммуноферментных тест-систем для детекции антител к респираторно-синцитиальному вирусу с использованием электронной микроскопии и моноклональных антител // *Вопр. вирусологии*. — 1999. — № 6. — С. 279-284.
2. Кривицкая В.З., Соминина А.А., Суховецкая В.Ф., Милькинт К.К., Сверлова М.В. Иммунопатологический аллергический Th2-тип противовирусного гуморального иммунного ответа у детей с респираторно-синцитиальной вирусной инфекцией // *Цитокины и воспаление*. — 2004. — Т. 3, № 3. — С. 34-41.
3. Методические указания по работе опорных баз Всесоюзного центра по гриппу и острым респираторным заболеваниям. — Л., 1986. — 55 с.
4. Bartz H., Buning-Pfaue F., Turkel O., Schauer U. Respiratory syncytial virus induces prostaglandin E2, IL-10 and IL-11 generation in antigen presenting cells // *Clin. Exp. Immunol.* — 2002. — Vol. 129, N 3. — P. 438-445.
5. Baumgarth N., Tung J., Herzenberg L. Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion // *Springer Semin. Immunopathol.* — 2005. — Vol. 26, N 4. — P. 347-362.
6. Becker Y. Respiratory syncytial virus (RSV) evades the human adaptive immune system by skewing the Th1/Th2 cytokine balance toward increased levels of Th2 cytokines and IgE, markers of allergy — a review // *Virus Genes*. — 2006. — Vol. 33, N 2. — P. 235-252.
7. Boes M., Esau C., Fischer M., Schmidt T., Carroll M., Chen J. Enhanced B-1 cell development, but impaired IgG antibody responses in mice deficient in secreted IgM // *J. Immunol.* — 1998. — Vol. 160. — P. 4776-4787.
8. Diaz P., Calhoun W.J., Hinton K.L., Rojas M.G., Avendano L.F., Gaggero A., Diaz A., Arredondo S. IFN- and IL-4 production by in vitro RSV and adenoviral infection blood mononuclear cells // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 1996. — Vol. 153. — Abstract A502.
9. Fehr T., Bachmann M.F., Bucher E., Kalinke U., Di Padova F.E., Lang A.B., Hengartner H., Zinkernagel R.M. Role of repetitive antigen patterns for induction of antibodies against antibodies // *J. Exp. Med.* — 1997. — Vol. 185, N 10. — P. 1785-1792.
10. Jafri H., Chavez-Bueno S., Mejias A., Gomez A., Rios A., Nassi S., Yusuf M., Kapur P., Hardy R., Hatfield J., Rogers B., Krisner K., Ramilo O. Respiratory syncytial virus induces pneumonia, cytokine response, airway obstruction, and chronic inflammatory infiltrates associated with long-term airway hyperresponsiveness in mice // *J. Infect. Dis.* — 2004. — Vol. 189, N 10. — P. 1856-1865.
11. Kajon A., Gigliotti A., Harrod K. Acute inflammatory response and remodeling of airway epithelium after subspecies B1 human adenovirus infection of the mouse lower respiratory tract // *J. Med. Virol.* — 2003. — Vol. 71, N 2. — P. 233-244.
12. Kerr J., Barah F., Matthey D., Laing I., Hopkins S., Hutchinson I., Tyrrell D. Circulating tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma are detectable during acute and convalescent parvovirus B19 infection and are associated with prolonged and chronic fatigue // *J. Gen. Virol.* — 2001. — Vol. 82, Pt. 12. — P. 3011-3019.
13. Merbl Y., Zucker-Toledano M., Quintana F.J., Cohen I.R. Newborn humans manifest autoantibodies to defined self molecules detected by antigen

microarray informatics // J. Clin. Invest. — 2007. — Vol. 117, N 3. — P. 712-718.

14. Orbach H., Shoenfeld Y. Vaccination infection and autoimmunity: myth and reality VIAMR 2005-10-26-28, Beau-Rivage Palace Hotel, Lausanne, Switzerland // Autoimmun. Rev. — 2007. — Vol. 6. — P. 261-266.

15. Pickl W.F., Pimentel-Muinos F.X., Seed B. Lipid rafts and pseudotyping // J. Virol. — 2001. — Vol. 75, N 15. — P. 7175-7183.

16. Shoenfeld Y., Poletaev A.B. Natural autoimmunity in physiology and pathology. 1st Moscow International Conference Moscow, Russia, September 15-17, 2005. — Autoimmun. Rev. — 2006. — Vol. 5. — P. 357-363.

17. Simpson C.R., Anderson W.J., Helms P.J., Taylor M.W., Watson L., Prescott G.J., Godden D.J.,

Barker R.N. Coincidence of immune-mediated diseases driven by Th1 and Th2 subsets suggests a common aetiology. A population-based study using computerized general practice data // Clin. Exp. Allergy. — 2002. — Vol. 32, N 1. — P. 37-42.

18. Yoon J.S., Kim H.H., Lee Y., Lee J.S. Cytokine induction by respiratory syncytial virus and adenovirus in bronchial epithelial cells // Pediatr. Pulmonol. — 2007. — Vol. 42, N 3. — P. 277-282.

19. Zhang M., Carroll M.C. Natural antibody mediated innate autoimmune response // Mol. Immunol. — 2007. — Vol. 44, N 1-3. — P. 103-110.

поступила в редакцию 30.01.2008

отправлена на доработку 17.02.2008

принята к печати 11.03.2008