

# IgM АУТОАНТИТЕЛА К ДНК В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКОЙ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ

Ишмухаметова Д.Г.<sup>1</sup>, Темесген Б.К.<sup>2</sup>, Якушева О.В.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Кафедра биохимии, Казанский государственный университет, г. Казань

<sup>2</sup> College of Medicine and Health Sciences, Hawassa University, Ethiopia

<sup>3</sup> Учреждение Российской Академии наук Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, г. Казань

**Резюме.** Исследовано содержание IgM аутоантител (ААТ) к нативной и денатурированной ДНК в сыворотке крови 60 больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом (ГЛПС) и 25 здоровых лиц методом ИФА. Средний уровень содержания IgM ААТ к нативной ДНК в сыворотке крови здоровых лиц и больных ГЛПС по медиане составляет 0,41 и 0,53 отн.ед. соответственно, и различие между ними является статистически недостоверным. Содержание IgM ААТ к денатурированной ДНК в сыворотке крови больных ГЛПС по медиане составляет 0,71 отн.ед, и оно достоверно превышает среднее значение содержания IgM ААТ к денатурированной ДНК в группе здоровых лиц (0,57 отн.ед.). Обсуждается возможность участия IgM ААТ в регуляции синтеза IgG ААТ при вирус-индуцированной активации аутоиммунных процессов в организме больных ГЛПС.

**Ключевые слова:** аутоиммунитет, IgM аутоантитела к ДНК, геморрагическая лихорадка, почечный синдром.

*Ishmukhametova D.G., Temesgen B.K., Yakusheva O.V.*

## IgM AUTOANTIBODIES TO DNA IN BLOOD SERUM OF THE PATIENTS WITH HEMORRHAGIC FEVER WITH RENAL SYNDROME

**Abstract.** Levels of IgM autoantibodies (AAbs) to native (double-stranded) and denatured (single-stranded) DNA were studied in blood serum of sixty patients with hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) and twenty-five healthy persons, using an ELISA technique. The median levels of IgM AAbs to double-stranded DNA in blood serum of healthy persons and HFRS patients corresponded to 0.41 and 0.53 arbitrary units, respectively. Thus, the difference between the samples from HFRS and healthy persons proved to be non-significant. The median level of IgM AAbs to single-stranded DNA in blood sera of HFRS patients (0.71 arbitrary units) did significantly exceed serum values of healthy persons (0.57 arbitrary units). A probable involvement of IgM AAbs into regulation of IgG AAbs' production during virus-induced activation of autoimmune events in HFRS patients is discussed. (*Med. Immunol., vol. 12, N 4-5, pp 375-380*)

**Keywords:** autoimmunity, anti-DNA IgM autoantibodies, hemorrhagic fever, renal syndrome.

## Введение

Развитие вирусных заболеваний часто приводит к активации аутоиммунных процессов в организме больного. Объясняется это тем, что при вторжении в организм вирусов происходит поликлональная активация анергических аутореактивных В-лимфоцитов, которые начинают вырабатывать гетерогенные полиреактивные аутоантитела (ААТ) ко многим типам собствен-

ных антигенов, в том числе к ДНК. ААТ к денатурированной ДНК, к ревматоидному фактору выявляются в сыворотке крови пациентов при заражении вирусом иммунодефицита человека [5, 21]. Для вирусного гепатита характерно присутствие в сыворотке крови больных антинуклеарных антител, ревматоидного фактора [11, 16]. Инфицирование вирусом лихорадки Денгги сопровождается образованием ААТ к тромбоцитам и эндотелиальным клеткам [15]. Повышенный уровень содержания ААТ к ДНК выявляется у большинства больных, инфицированных вирусом клещевого энцефалита [1].

Активация аутоиммунных процессов во многих случаях сопровождается развитием симптомов аутоиммунных патологий, осложняющих

### Адрес для переписки:

Ишмухаметова Диляра Галимовна  
420101, г. Казань, ул. Мавлютова, д. 21, кв. 17.  
Тел.: (843) 229-85-39.  
E-mail: dilgal@yandex.ru

течение основного заболевания. Ярким примером является геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС), вызываемая РНК-содержащими хантавирусами. Высокая летальность при ГЛПС обусловлена системным поражением сосудов, в особенности микроциркуляторного русла почек из-за отложения на них циркулирующих иммунных комплексов, содержащих, наряду с антителами к вирусу, ААТ к собственным антигенам [7].

Ранее нами показано, что в сыворотке крови больных ГЛПС выявляются IgG ААТ к ДНК, и уровень содержания IgG ААТ к денатурированной ДНК в 2 раза превышает уровень их содержания в сыворотке крови здоровых лиц [3]. Повышенный уровень IgG ААТ к ДНК рассматривается как один из основных патогенетических факторов при многих аутоиммунных заболеваниях (АИЗ) [14] и используется при их диагностике.

Однако высокий уровень содержания IgG ААТ к ДНК не всегда ассоциирует с обострением АИЗ [14]. Замечено, что в некоторых случаях выявляется изменение соотношения ААТ IgG и IgM изотипов, с доминированием IgM ААТ [13].

Роль IgM ААТ к ДНК в развитии аутоиммунных процессов не до конца выяснена, но существует предположение о возможном их участии в регуляции уровня содержания IgG ААТ [12].

**Целью настоящей работы** явилось исследование уровня содержания IgM ААТ к ДНК в сыворотке крови больных ГЛПС и здоровых лиц.

## Материалы и методы

**Объект исследования.** В работе использованы образцы сыворотки крови больных ГЛПС, находившихся на стационарном лечении в городской клинической инфекционной больнице г. Казани. В качестве контроля использовали образцы сыворотки крови практически здоровых людей, проходящих плановые медицинские осмотры в лечебных учреждениях г. Казани. В качестве положительного стандарта при определении ААТ к ДНК использовали сыворотки крови больных СКВ из республиканской клинической больницы № 2 г. Казани.

Для приготовления сыворотки кровь отбирали из локтевой вены в стерильную пробирку и инкубировали при 37 °С в течение 1-1,5 часов для формирования сгустка. Сгусток осторожно отделяли от стенок пробирки, обводя их тонкой металлической пластинкой. Затем кровь инкубировали в течение 2-3 часов при 4 °С для ретракции сгустка. Сыворотку декантировали и центрифугировали сначала в течение 5 минут при 1500 об/мин, надосадок сливали и его еще раз центрифугировали при 5000 об/мин в течение 20 минут для полного удаления оставшихся клеточных элементов. Полученную сыворотку разливали

по 20-50 мкл и аликвоты хранили в замороженном виде при -20 °С.

**Определение содержания IgM ААТ к ДНК.** Содержание IgM ААТ к ДНК определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА). В работе использованы полистироловые планшеты (ГосНИИ «Медполимер», Россия), на которых сорбировали ДНК-антиген, согласно методике, модифицированной ранее в нашей лаборатории [6]. В качестве антигена использовали нативную ДНК (нДНК) из эритроцитов цыплят («Reanal», Венгрия). Степень депротенинизации препарата ДНК оценивали по соотношению оптических плотностей раствора ДНК при длинах волн 280 и 260 нм ( $E_{280}/E_{260}$ ), о нативности препарата ДНК судили по величине гиперхромного эффекта. Денатурированную ДНК (дДНК) получали методом термической денатурации. Непосредственно перед постановкой реакции ИФА образцы сыворотки крови прогревали на водяной бане при 56 °С в течение 40 мин для инактивации белков системы комплемента. В качестве вторичных антител использовали меченые пероксидазой антитела против IgM человека (МА2/НРР к IgM человека), именуемые далее как «конъюгат» («Сорбент Лтд», Россия). Рабочую концентрацию конъюгата определяли, исходя из данных предварительного эксперимента по выяснению оптимального разведения каждой серии конъюгата.

Для стандартизации результатов всей серии экспериментов каждый раз параллельно анализировали одну и ту же положительно реагирующую с ДНК сыворотку крови больных СКВ, обозначенную как «стандарт». Содержание ААТ к ДНК в сыворотке крови оценивали в относительных единицах (отн.ед.), которые вычисляли, как отношение ОП<sub>492</sub>опыт/ОП<sub>492</sub>стандарт. Характер распределения данных в полученных выборках индивидуальных значений уровня содержания ААТ анализировали с применением структурного среднего – медианы и перцентилей (2,5; 25; 75; 97,5) [4]. Для оценки различий между выборками использовали Т-критерий Манна–Уитни [4].

## Результаты

Методом ИФА исследовано содержание IgM ААТ к нативной и денатурированной ДНК в сыворотке крови 60 больных и 25 здоровых лиц.

Во всех анализируемых образцах сыворотки крови выявлены IgM ААТ к обоим типам ДНК. Индивидуальные значения уровня содержания IgM ААТ к нативной ДНК в сыворотке крови здоровых лиц колеблются от 0,08 до 0,96 отн.ед. (рис. 1Б), у больных ГЛПС – в пределах от 0,16 до 1,25 отн.ед. (рис. 1А).

Содержание IgM ААТ к денатурированной ДНК в сыворотке крови здоровых лиц варьирует от 0,20 до 0,96 отн.ед. (рис. 2Б), в группе больных – от 0,32 до 1,39 отн.ед. (рис. 2А). На рисун-

ке 3 приведена частота встречаемости индивидуальных уровней содержания IgM ААТ к нативной и денатурированной ДНК в группе больных ГЛПС и здоровых лиц. Из рисунка видно, что встречаемость индивидуальных уровней содержания IgM ААТ к нативной ДНК в группах больных и здоровых лиц сходны (рис. 3А). На кривой частоты встречаемости индивидуальных уровней содержания IgM ААТ к денатурированной ДНК в группе больных ГЛПС преобладают высокие значения по сравнению с группой здоровых лиц (рис. 3Б).

Характер распределения индивидуальных показателей содержания IgM ААТ в исследуемых группах не подчиняются закону нормального распределения. Средний уровень содержания IgM ААТ к ДНК в группах больных ГЛПС и здоровых лиц, вычисленный с использованием медианы и перцентилей, представлен в таблице 1.

Среднее значение содержания IgM ААТ к нДНК для здоровых лиц и больных ГЛПС по медиане составляет 0,41 и 0,53 отн.ед. соответственно; различие между ними является статистически недостоверным. Содержание IgM ААТ к дДНК по медиане в сыворотке крови больных ГЛПС (0,71 отн.ед.) достоверно превышает среднее значение содержания ААТ к дДНК в группе здоровых лиц (0,57 отн.ед.).

## Обсуждение

Во всех исследуемых образцах сыворотки крови больных ГЛПС и здоровых лиц обнаружены IgM ААТ как к нативной, так и к денатурированной ДНК. Индивидуальные значения уровня со-

держания IgM ААТ к нДНК в сыворотке крови в группе здоровых лиц варьирует от 0,02 до 0,96 отн.ед., в группе больных ГЛПС – от 0,16 до 1,25 отн.ед. (рис. 1).

Колебания индивидуальных значений содержания IgM ААТ к дДНК в группе здоровых лиц находятся в пределах 0,2-0,96 отн.ед., в группе больных – от 0,32 до 1,39 отн.ед. (рис. 2).

Анализ частоты встречаемости индивидуальных значений содержания IgM ААТ к ДНК показал, что кривая распределения индивидуальных значений содержания IgM ААТ к нДНК в группах больных ГЛПС и здоровых лиц сходна (рис. 3А), в то время как частота встречаемости индивидуальных значений содержания IgM ААТ к дДНК в группе больных ГЛПС заметно смещена в область более высоких значений по сравнению с группой здоровых лиц (рис. 3Б).

Варьирование индивидуальных значений содержания IgM ААТ к обоим типам ДНК в исследуемых группах проявляет выраженную асимметрию и не подчиняется закону нормального распределения [4]. В связи с этим оценку средних значений содержания IgM ААТ к ДНК в исследуемых группах проводили с использованием медианы, 2,5-го и 97,5-го перцентилей [2].

Средний уровень содержания IgM ААТ к дДНК по медиане в группе больных ГЛПС составляет 0,71 отн.ед., в группе здоровых лиц – 0,57 отн.ед. 50% индивидуальных показателей в группе больных ГЛПС (между 25-м и 75-м перцентилеями) находятся в пределах 0,57 и 0,84 отн.ед. (табл. 1), что достоверно превышает

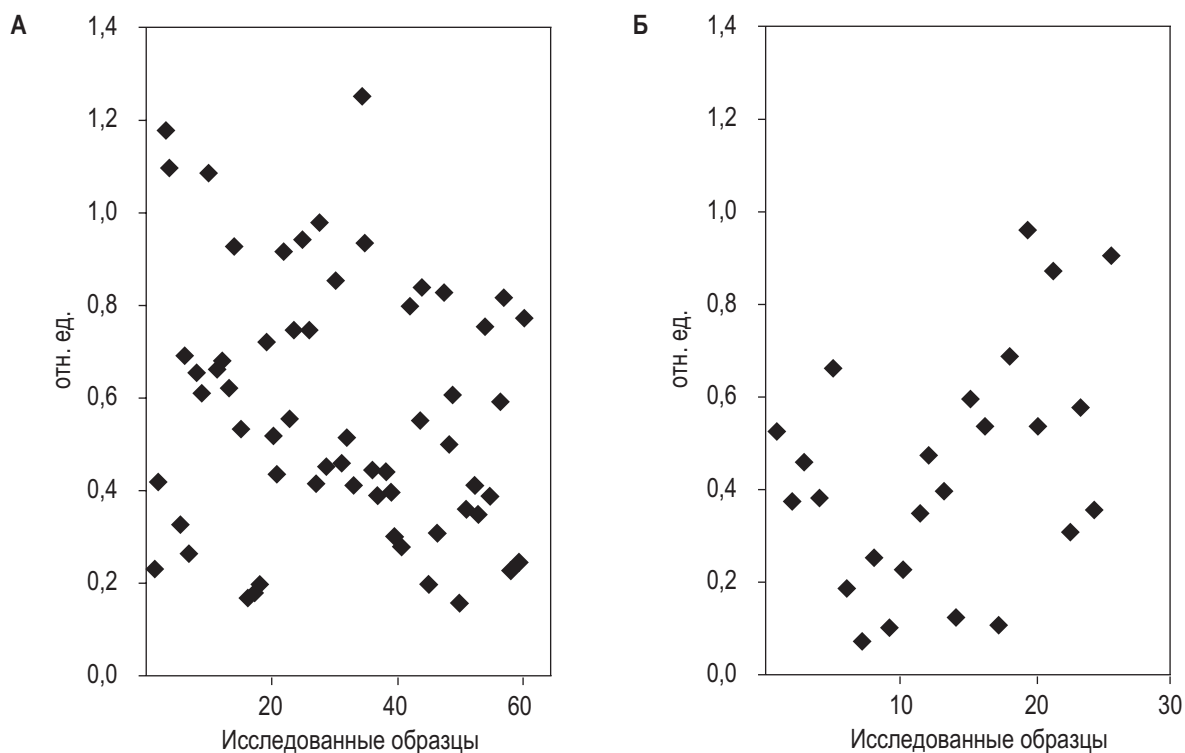
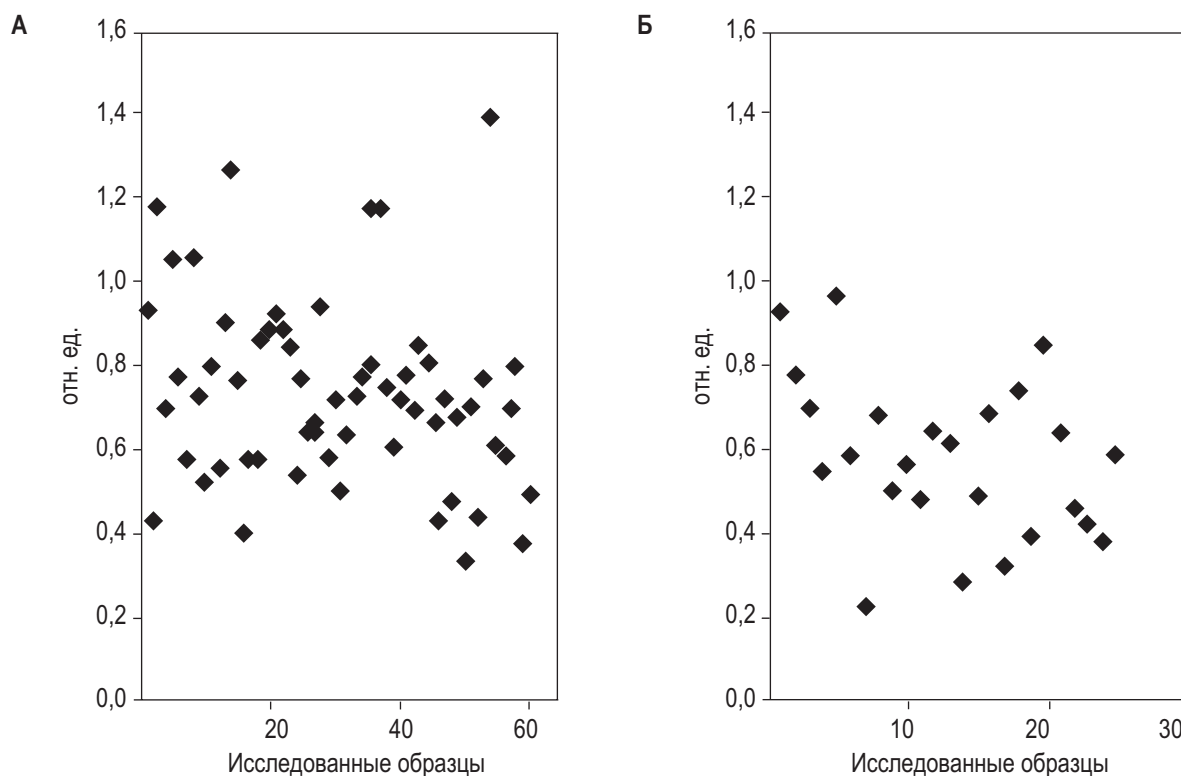


Рисунок 1. Содержание IgM ААТ к нативной ДНК в сыворотке крови больных ГЛПС (А) и здоровых доноров (Б)



**Рисунок 2. Содержание IgM ААТ к денатурированной ДНК в сыворотке крови больных ГЛПС (А) и здоровых лиц (Б)**

ет соответствующие значения в группе здоровых лиц. Различие между средним содержанием IgM ААТ к нДНК в сыворотке крови больных и здоровых лиц (0,53 и 0,41 отн.ед.) является статистически недостоверным.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что развитие ГЛПС сопровождается активацией аутоиммунных реакций, выражающейся в значительном повышении содержания в сыворотке крови больных ААТ к дДНК как IgG, так и IgM изотипов.

Циркулирующие в сыворотке крови больных ГЛПС пулы IgG и IgM ААТ к ДНК имеют разное происхождение и, по-видимому, выполняют разные функции [9]. Естественные циркулирующие IgM ААТ синтезируются В-1 клетками [18, 8], которые отличаются от зрелых В-клеток, продуцентов IgG, по поверхностным маркерам и, соответственно, механизму активации. IgG ААТ к ДНК рассматриваются как один из цитотоксических факторов, способствующих развитию гломерулонефрита при системных АИЗ [14]. Вклад IgM ААТ в развитие аутоиммунных патологий менее изучен, но имеются сведения, указывающие на возможность участия IgM ААТ в регуляции синтеза IgG ААТ и защите от развития аутоиммунных патологий при инфекциях. Так, в работе Ehrenstein с сопр. [12] показано, что при введении липополисахаридов (ЛПС) клеточной стенки бактерий нормальным мышам и мутантным мышам, дефицитным по IgM, антитела к ЛПС появляются в сыворотке крови мышей обеих групп, а повышение уровня содержания IgG ААТ к ДНК

обнаруживалось только у мышей, дефицитных по IgM. Замечено, что у мышей, дефицитных по IgM, наблюдается высокий уровень содержания IgG ААТ в сыворотке крови и спонтанно возникают симптомы, характерные для классических АИЗ.

При работе с мутантными мышами, предрасположенными к АИЗ, показано, что у их трансгенных сородичей, у которых заблокирован ген синтеза IgM ААТ, наблюдается более высокий уровень IgG ААТ в сыворотке крови по сравнению с мышами с нормальным уровнем содержания IgM ААТ [10]. О возможной защитной роли IgM ААТ, специфичных к ДНК, свидетельствуют результаты недавних исследований, в которых показано, что введение мышам с волчанкой IgM ААТ к ДНК замедляет у них развитие АИЗ и повышает выживаемость животных [20].

Роль IgM ААТ в регуляции уровня содержания IgG ААТ и защите от развития АИЗ может быть связана с участием IgM ААТ в клиренсе апоптотических клеток, дефект удаления которых является одной из основных причин активации аутореактивных клеток [17]. Известно, что естественные IgM ААТ обладают сродством к лизофосфатидилхолину (ЛФХ), который экспрессируется на поверхности апоптотических клеток. Связываясь с апоптотическими клетками через ЛФХ на их поверхности, IgM способствует активации комплемента, поверхность апоптотических клеток покрывается С3b, что способствует их усиленному фагоцитозу макрофагами. Поглощение апоптотических клеток макрофагами

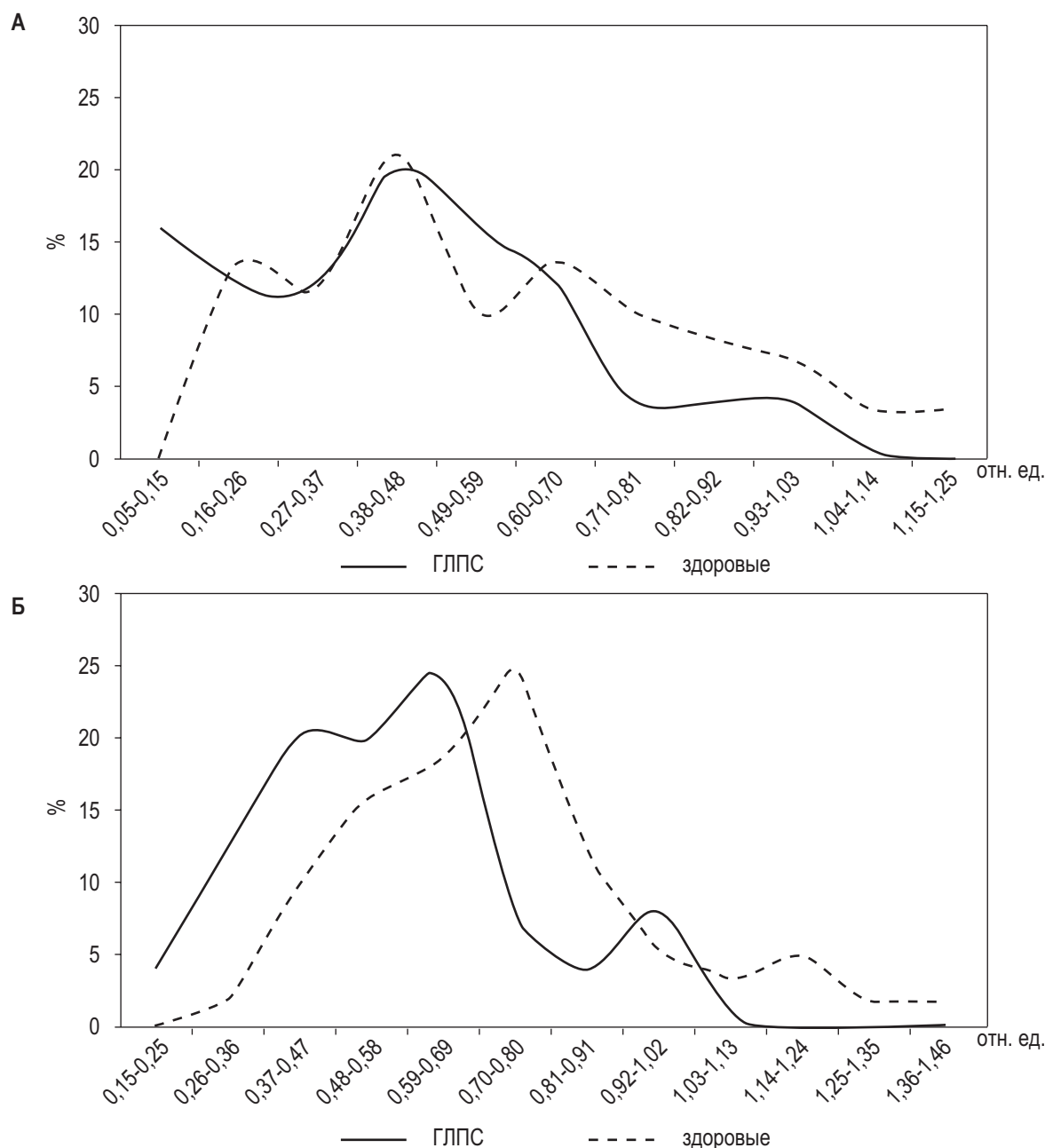


Рисунок 3. Частота встречаемости индивидуальных уровней содержания IgM ААТ к нДНК (А) и дДНК (Б) в сыворотке крови больных ГЛПС и здоровых лиц (в % от обследованных)

ТАБЛИЦА 1. УРОВЕНЬ СОДЕРЖАНИЯ IgM ААТ К ДНК (ОТН.ЕД.) У БОЛЬНЫХ ГЛПС И ЗДОРОВЫХ ЛИЦ

ААТ к ДНК		ГЛПС (n = 60)	Здоровые (n = 25)
нДНК	Медиана	0,53*	0,41*
	2,5-й перцентиль	0,17	0,10
	25-й перцентиль	0,38	0,25
	75-й перцентиль	0,76	0,58
	97,5-й перцентиль	1,14	0,93
дДНК	Медиана	0,71**	0,57**
	2,5-й перцентиль	0,38	0,24
	25-й перцентиль	0,57	0,43
	75-й перцентиль	0,84	0,67
	97,5-й перцентиль	1,22	0,93

Примечание. \* – различие статистически недостоверно; \*\* – различие статистически достоверно ( $p < 0,05$ ).

сопровождается выделением последними сигнальных молекул, подавляющих активность аутореактивных В-1 лимфоцитов [19].

Выявленные нами IgM ААТ к ДНК в сыворотке крови больных ГЛПС представляют собой гетерогенный пул разных кластеров IgM ААТ к ДНК, содержащий как естественные секреторные IgM ААТ, циркулирующие в норме, так и IgM ААТ, синтезированные в результате вирус-индуцированной активации аутореактивных В-1 клеток. Выявление в пуле IgM ААТ к ДНК апоптоз-ассоциированных кластеров, участвующих в гомеостатической защите от аутоиммунных процессов при вирусной инфекции требует дальнейших исследований.

## Список литературы

1. Гармашова Н.В., Казанский В.Е., Тышкевич О.Б., Доронин Б.М., Бунева В.Н., Невинский Г.А. Антитела к ДНК в крови больных клещевым энцефалитом // Молекулярная биология. – 2004. – Т.29. – С. 723-730.
2. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1999. – 459 с.
3. Ишмухаметова Д.Г., Темесген Б.К., Власова О.В., Бабушкина Ф.А. Аутоантитела к ДНК в сыворотке крови больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом // Медицинская иммунология. – 2006. – Т. 8., № 5-6. – С. 653-658.
4. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
5. Рязанова Г.А., Коксин В.П., Хамзина Р.В. Свободные и связанные антитела к структурным белкам ВИЧ-1 в ранний период заболевания // Медицинская иммунология. – 2005. – Т. 7, № 1. – С. 73-76.
6. Саттарова Л.И., Гафиятуллина Л.А., Аглиуллина Д.Г. Оптимизация иммуноферментной тест-системы для определения антител к ДНК // Биотехнология. – 1994. – Т. 11, № 12. – С. 38-41.
7. Сомова-Исачкова Л.М., Плехова Н.Г. Патоморфогенез геморрагической лихорадки с почечным синдромом: от прошлого к будущему // Хантавирусы и хантавирусные инфекции. – Владивосток: ОАО «Примполиграфкомбинат», – 2003. – С. 182-200.
8. Baumgarth N., Herman O.C., Jager G.C., Brown L.E., Herzenberg L.A., Chen J. B-1 and B-2 cell-derived immunoglobulin M antibodies are nonredundant components of the protective response to influenza virus infection // J. Exp. Med. – 2000. – Vol. 192. – P. 271-280.
9. Boes M. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses // Mol. Immunol. – 2000. – Vol. 37. – P. 1141-1149.
10. Boes M., Schmidt T., Linkemann K., Beaudette B.C., Marshak-Rothstein A., Chen J. Accelerated development of IgG autoantibodies and autoimmune disease in the absence of secreted IgM // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – Vol. 97. – P. 1184-1189.
11. Clifford B.D., Donahue D., Smith L., Cable E., Luttig B., Manns M., Bonkovsky H.L. High prevalence of serological markers of autoimmunity in patients with chronic hepatitis C // Hepatology. – 1995. – Vol. 21. – P. 613-619.
12. Ehrenstein M.R., Cook H.T., Neuberger M.S. Deficiency in serum immunoglobulin (Ig) M predisposes to development of IgG autoantibodies // J. Exp. Med. – 2000. – Vol. 191. – P. 1253-1258.
13. Li Q.Z., Zhou J., Wandstrat A.E., Carr-Johnson F., Branch V., Karp D.R., Mohan C., Wakeland E.K., Olsen N.J. Protein array autoantibody profiles for insights into systemic lupus erythematosus and incomplete lupus syndromes // Clin. Exp. Immunol. – 2007. – Vol. 147. – P. 60-70.
14. Limaye N., Mohan C. Pathogenicity of anti-DNA and glomerular autoantibodies: weighing the evidence // Drug Discovery Today: Disease Models. – 2004. – Vol. 1. – P. 395-403.
15. Lin C.F., Lei H.Y., Shiao A.L., Liu C.C., Liu H.S., Yeh T.M., Chen S.H., Lin Y.S. Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage // J. Med. Virol. – 2003. – Vol. 69. – P. 82-90.
16. Pawlotsky J., Yahia M., Andre C., Voisin M.C., Intrator L., Roudot-Thoraval F., Deforges L., Duvoux C., Zafrani E.S., Duval J., Dhumeaux D. Immunologic disorders in C virus chronic active hepatitis: a prospective case-control study // Hematology. – 1994. – Vol. 19. – P. 841-848.
17. Peng Y.F., Kowalewski R., Kim S.J., Elkon K.B. The role of IgM antibodies in the recognition and clearance of apoptotic cells // Mol. Immunol. – 2005. – Vol. 42. – P. 781-787.
18. Shaw P.X., Horkko S., Chang M.K., Curtiss L.K., Palinski W., Silverman G.J., Witztum J.L. Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance, and protective immunity // J. Clin. Invest. – 2000. – Vol. 105. – P. 1731-1740.
19. Silverman G.J., Srikrishnan R., Germar K., Goodyear C.S., Andrews K.A., Ginzler E.M., Tsao B.P. Genetic imprinting of autoantibody repertoires in systemic lupus erythematosus patients // Clin. Exp. Immunol. – 2008. – Vol. 153. – P. 102-116.
20. Werwitzke S., Trick D., Kamino K., Matthias T., Kniesch K., Schlegelberger B., Schmidt R.E., Witte T. Inhibition of lupus disease by anti-double-stranded DNA antibodies of the IgM isotype in the (NZB x NZW) F1 mouse // Arthritis Rheum. 1891. – 2005. – Vol. 52. – P. 3629-3638.
21. Zandman-Goddard G., Shoenfeld Y. HIV and autoimmunity // Autoimmunity Reviews. – 2002. – Vol.1. – P. 329-337.

поступила в редакцию 15.02.2010  
принята к печати 24.02.2010