

КЛИНИЧЕСКАЯ ИММУНОГЕНЕТИКА ПРОТИВОВИРУСНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ КЛЕЩЕВОМ ЭНЦЕФАЛИТЕ

Лариса Олеговна ЧЕРНИЦЫНА¹, Владимир Иосифович КОНЕНКОВ²

¹ ГУ НИИ региональной патологии и патоморфологии СО РАМН

630117, Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 2

² ГУ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН

630117, Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 4

Проведено иммунологическое и иммуногенетическое обследование пациентов с клещевым энцефалитом. Сравнение оппозитных групп, выделенных по наличию или отсутствию того или иного иммуногенетического маркера в фенотипе больного, по уровню синтеза антител позволило выявить достоверные ассоциации между определенным HLA-фенотипом и силой гуморального иммунного ответа на различные антигены вируса клещевого энцефалита. Антиген HLA-B12 ассоциировался с высоким уровнем специфических антител класса IgM к неструктурному белку NS1 вируса клещевого энцефалита, а HLA-DR7 — с высокой положительной динамикой гуморального иммунного ответа антител основных классов (IgM и IgG) к неструктурному белку NS1 репликативного комплекса вируса клещевого энцефалита. Другие антигены, HLA-A1 — для IgM-антител и HLA-A3 — для IgG-антител, ассоциировались с более низкими уровнями антител в динамике специфического иммунного ответа на антиген Е оболочки вируса клещевого энцефалита ВКЭ, а антиген HLA-A28 — с низким уровнем IgG-антител к белкам Е и NS1 вируса клещевого энцефалита. Процессы синтеза специфических антител в указанных оппозитных группах протекали с одинаковой направленностью, но достоверно различались количественно.

Ключевые слова: клещевой энцефалит, иммунный ответ, антигены HLA-комплекса.

Одной из основных задач клинической иммуногенетики инфекционных заболеваний является исследование взаимосвязи восприимчивости человека к данному заболеванию с определенной системой генетических факторов, ассоциированных с силой иммунного ответа против антигенов возбудителя и имеющих различное иммунологическое проявление. Иммуногенетические признаки могут принимать непосредственное участие в создании противоинфекционной защиты — в том или ином механизме или этапе иммунного ответа [1, 2].

В исследованиях предыдущих лет нами был проведен клинико-иммуногенетический анализ клещевого энцефалита (КЭ) у городского населения Западной Сибири, определена прогностическая ценность иммуногенетических маркеров макроорганизма (аллельных вариантов генов HLA-комплекса) для прогнозирования predispositionности или устойчивости к развитию заболевания КЭ [3], особенностей клинического течения (формы и варианта развития инфекции) [4], исхода острого КЭ — выздоровления или хронизации инфекции [5].

Известно, что полиморфизм HLA-системы затрудняет адаптацию инфекционных агентов в человеческой популяции. По современным представлениям, люди с разными генотипами

характеризуются выраженными различиями в иммунном ответе (ИО) на один и тот же антигенный стимул. Ранее нами была показана ассоциированность аллельных вариантов HLA-комплекса I класса с интенсивностью гуморального ИО к вирусу КЭ (ВКЭ) в динамике заболевания [6], выявлены особенности антителопродукции к структурным и неструктурным белкам ВКЭ в динамике инфекционного процесса при различных формах и вариантах течения инфекции [7].

Структурный белок Е ВКЭ — основной иммуноген вируса. Неструктурный белок NS1 ВКЭ является белком репликативного комплекса вируса [8]; он не только продуцируется в инфицированных вирусом клетках в сравнительно больших количествах, но и единственный из всех неструктурных белков ВКЭ секретируется за пределы зараженной клетки, одновременно существуя как во внеклеточной форме, так и на мембранах инфицированных клеток [9, 10].

С целью определения характера ассоциированности антигенов HLA-комплекса с уровнем противовирусных антител основных классов (IgM и IgG) к различным белкам ВКЭ выполнено комплексное иммунологическое и иммуногенетическое обследование лиц, заболевших КЭ после укуса вирусиферным клещом.

Черницына Л.О. — канд.м.н., зав. лабораторией клещевых инфекций Отдела региональных проблем инфекционной патологии, e-mail: neuroinf@mail.ru

Коненков В.И. — академик РАМН, директор

Материал и методы исследования

Специфический ИО на ВКЭ у больных КЭ оценивали с использованием тест-систем иммуноферментного анализа, сконструированных в лаборатории А.С. Караванова (ГУ Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН, г. Москва), в динамике инфекционного процесса (в первые 4 дня заболевания, в последующем еженедельно — с 7 по 28 день болезни) [7]. Полученные значения титров специфических иммуноглобулинов класса М и G в сыворотке крови преобразовывали для статистической обработки в виде \log_2 средней геометрической обратного титра антител.

Сравнение оппозиционных групп, выделенных по наличию или отсутствию того или иного иммуногенетического маркера в фенотипе больного КЭ, по уровню синтеза IgM- и IgG-антител, проводили с использованием особого варианта двухфакторного дисперсионного анализа, предложенного Н.А. Плохинским [11]. Сравнение двух процессов проходило по двум показателям — по среднему уровню течения процессов (критерий F_1) и по расхождению направления процессов, т.е. по непараллельности или параллельности их течения (критерий F_2). Достоверность различия среднего уровня течения процессов контролировалась превышением эмпирических показателей критериев (F_1 , F_2) над теоретическим критерием Фишера (Fst) для соответствующего уровня значимости [12]. В использованном нами алгоритме Н.А. Плохинского первый фактор имел 2 градации (A_1 , A_2), соответствующие двум сравниваемым группам (процессам), а второй фактор имел несколько градаций (B_1 , B_2 , ..., B_3) по числу организованных во времени точек наблюдения за динамикой гуморального ИО на различные антигены ВКЭ. После того, как достоверно устанавливали действие фактора, измеряли силу его влияния на исследуемые процессы. Применяли основной способ измерения силы влияния факторов А и В в общей сумме всех случайных, неорганизованных в исследовании факторов на течение инфекционного процесса в оппозиционных группах путем вычисления квадрата пирсоновского корреляционного отношения [11]. Критерий достоверности влияния — $F_1(a)$ и $F_1(b)$ — получали как отношение показателя силы влияния к его ошибке, сравнивали его с Fst для соответствующего уровня значимости [13].

Типирование антигенов гистосовместимости I класса было проведено у 42 больных

КЭ (у 14 человек с лихорадочной, у 17 — с менингеальной и у 11 — с очаговой формой КЭ) в стандартном микролимфоцитотоксическом тесте [14] с использованием панели гистотипирующих сывороток ГУ НИИ гематологии и переливания крови (г. Санкт-Петербург), состоящей из 98 сывороток против 29 антигенов локусов А, В и С системы HLA. Антигены HLA-DR выявляли с помощью соответствующих сывороток против 10 антигенов II класса, типирова В-лимфоциты, выделенные на колонках с нейлоновой ватой. HLA-типирование по II классу было проведено у 23 больных КЭ (у 7 — с лихорадочной, у 9 — с менингеальной и у 7 — с очаговой формой заболевания).

Результаты исследования

Сравнение оппозиционных групп, выделенных по наличию или отсутствию того или иного иммуногенетического маркера в фенотипе больного, по уровню синтеза антител позволило выявить достоверные ассоциации между определенным HLA-фенотипом и силой гуморального ИО на различные антигены ВКЭ. В таблице приведены данные по HLA-антигенам, по которым оппозиционные группы достоверно различались по среднему уровню течения процесса синтеза специфических антител различных классов (критерий F_1). По критерию F_2 , характеризующему непараллельность течения процессов, достоверных различий выявлено не было. Таким образом, процессы в оппозиционных группах протекали с одинаковой направленностью, но достоверно различались количественно.

Антиген HLA-B12 ассоциировался с высоким уровнем специфических антител класса IgM к неструктурному белку NS1 ВКЭ, а HLA-DR7 — с высокой положительной динамикой гуморального ИО иммуноглобулинов основных классов (IgM и IgG) к неструктурному белку NS1 репликативного комплекса ВКЭ (в первые 14 дней болезни). Другие антигены, HLA-A1 — для IgM-антител и HLA-A3 — для IgG-антител, ассоциировались с более низкими уровнями антител в динамике специфического ИО на антиген Е оболочки ВКЭ, а антиген HLA-A28 — с низким уровнем IgG-антител к белку Е оболочки ВКЭ и неструктурному белку NS1 ВКЭ. Сила влияния того или иного иммуногенетического маркера в фенотипе больного КЭ на выраженность гуморального ИО на антигены ВКЭ была относительно небольшой (от 2,2 до 7,7%), но влияние этого фактора было достоверным ($p < 0,05$).

С целью выявления дополнительных имму-

Таблица

Ассоциированность HLA-антигенов с параметрами гуморального иммунного ответа к антигенам вируса клещевого энцефалита в динамике инфекционного процесса

HLA-маркер		Количество больных	Антитела к антигенам вируса КЭ		Дни недели					F1
					4	7	14	21	28	
A1	+	11	IgM	E	6,8 ± 1,9	12,7 ± 0,5	12,3 ± 0,3	13,0 ± 0,3	11,3 ± 1,2	4,8*
	—	31			8,9 ± 1,2	13,3 ± 0,4	13,1 ± 0,4	13,3 ± 0,3	12,9 ± 0,6	
A3	+	9	IgG	E	5,3 ± 1,3	7,0 ± 0,0	8,7 ± 0,7	9,0 ± 0,5	9,5 ± 0,6	6,7*
	—	33			6,9 ± 0,8	7,7 ± 0,9	11,0 ± 0,4	10,9 ± 0,3	10,6 ± 0,6	
A28	+	12	IgG	E	3,7 ± 1,4	6,3 ± 1,3	9,0 ± 0,5	9,9 ± 0,5	10,2 ± 1,3	7,4**
	—	30			7,0 ± 0,9	8,4 ± 0,6	10,2 ± 0,5	10,8 ± 0,4	10,8 ± 0,6	
	+	12	IgG	NS1	6,0 ± 1,6	7,2 ± 1,0	8,3 ± 0,3	8,0 ± 0,2	8,3 ± 0,5	6,0*
	—	30			8,6 ± 0,8	8,1 ± 0,6	9,3 ± 0,4	9,2 ± 0,4	9,1 ± 0,6	
B12	+	10	IgM	NS1	10,0 ± 0,5	10,0 ± 1,4	10,3 ± 1,5	11,4 ± 0,9	10,3 ± 1,1	6,7*
	—	32			8,0 ± 0,3	8,6 ± 0,9	8,4 ± 0,5	10,0 ± 0,4	9,7 ± 0,6	
DR7	+	8	IgM	NS1	8,7 ± 1,0	11,5 ± 0,8	10,8 ± 1,0	—	—	8,3*
	—	15			8,2 ± 0,4	7,8 ± 0,4	9,2 ± 0,2	—	—	
	+	8	IgG	NS1	9,0 ± 0,5	8,5 ± 0,4	9,7 ± 0,4	—	—	5,5*
	—	15			7,2 ± 1,5	6,2 ± 0,9	9,3 ± 1,1	—	—	

Примечание: значения содержания противовирусных антител класса IgM и IgG ($M \pm m$) представлены в виде \log_2 средней геометрической обратного титра антител; n — количество обследованных больных в оппозиционных группах; E и NS1 — обозначения антигенов ВКЭ; «—» — нет данных.

ногенетических маркеров высокого или низкого гуморального ИО на различные антигены ВКЭ, кроме сравнения оппозиционных групп по среднему уровню течения процесса синтеза антител методом Н.А. Плохинского, нами проведено также сравнение средней арифметической уровня иммуноглобулинов в динамике заболевания.

Исходя из средней арифметической уровня антител и среднеквадратического отклонения, были выделены следующие уровни содержания антител: низкие — от 0 до $M - 1\delta$, средние — находящиеся в диапазоне $M \pm 1\delta$, высокие — больше $M + 1\delta$. Соответственно низкими и высокими были следующие значения \log_2 уровня антител: для IgM-E-антител — $< 8,3$ ($n=6$) и $> 15,3$ ($n=9$), для IgM-NS1-антител — $< 7,3$ ($n=10$) и $> 11,3$ ($n=10$), для IgG-E-антител — $< 6,3$ ($n=6$) и $> 13,0$ ($n=3$), для IgG-NS1-антител — $< 6,3$ ($n=4$) и $> 10,3$ ($n=5$). Достоверность различий частот исследуемых признаков контролировалась с помощью точного метода Фишера с использованием четырехпольных таблиц [13].

В группе больных с высоким уровнем IgM-антител к белку E оболочки ВКЭ достоверно чаще встречались антигены HLA-Cw2 ($p < 0,05$)

и HLA-DR5 ($p < 0,05$), у пациентов с высоким содержанием IgM к неструктурному белку NS1 достоверно чаще встречался антиген HLA-DR7 ($p < 0,05$). Антиген HLA-B17 ассоциировался с низким уровнем антител класса G к белку NS1 репликативного комплекса ВКЭ ($p < 0,05$).

Таким образом, продемонстрировано, что определенные аллели HLA-комплекса I класса ассоциированы с преимущественной и более интенсивной (HLA-B12) или менее интенсивной (HLA-A1, -A3) продукцией определенных изотипов иммуноглобулинов в динамике иммунного ответа на антигены ВКЭ [6], что играет определенную роль в патогенезе КЭ: тяжелые формы КЭ с поражением ЦНС характеризуются дизиммуноглобулинемией — высоким уровнем специфических IgM-антител, низким уровнем IgG-антител, поздним переключением с синтеза IgM-антител на синтез IgG-антител. Высокий уровень IgM-антител к белку E оболочки ВКЭ встречался достоверно чаще в группе больных с поражением оболочки мозга ($p < 0,05$). Полученные нами данные соотносятся с экспериментальными данными О.В. Морозовой с соавт. [8]: в системе *in vitro* антитела к вирионному белку E обладали ярко

выраженным стимулирующим эффектом на синтез РНК ВКЭ.

Выявлены новые ассоциации силы гуморального ИО на ВКЭ с антигенами HLA I и II класса. При сравнении среднего уровня течения двух процессов по критериям Н.А. Плохинского показано, что аллели HLA-DR7 коррелируют с сильным гуморальным ИО на антигены ВКЭ (Е и NS1), а HLA-A28 — с низким уровнем ИО. При сравнении среднего арифметического уровня иммуноглобулинов в оппозиционных группах в динамике заболевания показана ассоциация HLA-Cw2, HLA-DR5 и HLA-DR7 с высоким, а HLA-B17 — с низким уровнем гуморального ИО на различные антигены ВКЭ.

Заключение

Показано, что интенсивность и закономерности развития гуморального ИО при КЭ тесно ассоциированы с набором аллельных вариантов генов HLA-комплекса, унаследованных данным индивидом. Закономерности развития противовирусного иммунитета при КЭ носят неслучайный характер. Они в значительной мере предопределены индивидуальными особенностями иммунной системы, которые, в свою очередь, тесно ассоциированы с генами главного комплекса гистосовместимости. Вероятным механизмом таких ассоциаций может служить связь между носительством определенных аллелей HLA-генов и отдельными параметрами иммунного статуса индивида, а также роль, которую играют HLA-молекулы лиц с различным HLA-фенотипом, в проявлении функциональной активности клеток иммунной системы индивида [14, 15].

Полученные данные могут найти применение в клинической практике при прогнозировании возможности развития тяжелой формы заболевания КЭ у лиц с определенным HLA-фенотипом или для прогноза уровня «защитных» антител после проведения вакцинации вакциной КЭ с целью отбора доноров с целью получения гипериммунной плазмы при изготовлении специфического иммуноглобулина для профилактики и лечения КЭ.

Литература

1. Иммунология инфекционного процесса / Под ред. В.И. Покровского, С.П. Гордиенко, В.И. Литвинова. М., 1994. 306.
Immunology of infectious process // Edited by V.I. Pokrovski, S.P. Gordienko, V.I. Litvinova. M., 1994. 306.
2. Прилуцкий А.С., Сохин А.А., Майлян Э.А. и др. Ассоциации некоторых генетических маркеров с интенсивностью антителообразования и динамикой

некоторых показателей реактивности детей при вакцинации живой коревой вакциной // Журн. микробиол., эпидемиол. иммунобиол. 1994. (5): 82-83.

Prilutski A.S., Sokhin A.A., Mailyan E.A. etc. Association of some genetic markers with intensity of antibodies formation and dynamics of some indexes of children reactivity at rubella vaccine vaccination // Zhurn. mikrobiol., epidemiol. immunobiol. 1994. № 5. 82-83.

3. Иерусалимский А.П., Черницына Л.О., Коненков В.И. Генетическая гетерогенность популяции лиц, заболевших различными клиническими формами клещевого энцефалита и устойчивых к развитию данного заболевания // Итоги науки и техники. Серия «Вирусология». Т. 27 «Арбовирусы и арбовирусные инфекции». Ч. I. М., 1992. 128-135.

Ierusalimski A.P., Chernitsyna L.O., Konenkov V.I. Genetic heterogeneity of people population with different forms of tick-borne encephalitis and resistant to this disease development // Itogi nauki i tekhniki. Issue «Virusology» V 27 «Arboviruses and arbovirus infections» Part 1 — Moskva, 1992. 128-135.

4. Черницына Л.О., Прокофьев В.Ф., Коненков В.И., Иерусалимский А.П. Иммуногенетические методы в прогнозе клинического течения клещевого энцефалита // Журн. невропатол. психиатр. им. С.С. Корсакова. 1990. 90 (11): 38-43.

Chernitsyna L.O., Prokofev V.F., Konenkov V.I., Ierusalimski A.P. Immunogenetic methods in prognosis for clinical course of tick-borne encephalitis // Zhurn. neuropatol. psikiatr. Im S.S. Korsakova. 1990. V. 90. № 11. 38-43.

5. Черницына Л.О., Коненков В.И., Иерусалимский А.П., Прокофьев В.Ф. Неоднородная последовательная процедура анализа генетических маркеров в разработке методов индивидуального прогноза исхода клещевого энцефалита // Иммунология. 1991. (6): 56-60.

Chernitsyna L.O., Konenkov V.I., Ierusalimski A.P., Prokofev V.F. Heterogeneous sequential procedure of analysis of genetic markers in development of methods of individual prognosis for tick-borne encephalitis outcome // Immunologiya. 1991. № 6. 56-60.

6. Черницына Л.О., Коненков В.И., Илюшенко Л.П., Прокофьев В.Ф. Ассоциированность аллельных вариантов генов HLA-комплекса класса I с интенсивностью гуморального иммунного ответа к антигенам вируса клещевого энцефалита в динамике заболевания // Иммунология. 1994. (6): 51-54.

Chernitsyna L.O., Konenkov V.I., Ilyushenko L.P., Prokofev V.F. Association of allele variants of genes of HLA-complex of class I with intensity of humoral immune response to antibodies of tick-borne encephalitis virus in dynamic of the disease. // Immunologiya. 1994. № 6. 51-54.

7. Черницына Л.О., Караванов А.С. Гуморальный иммунный ответ к структурным и неструктурным белкам вируса клещевого энцефалита в динамике заболевания: клинические и диагностические аспекты // Вopr. вирусологии. 2008. № 4. 27-30.

Chernitsyna L.O., Karavanov A.S. Humoral immune response to structural and non-structural proteins of tick-borne encephalitis virus in dynamic of the disease.: clinical and diagnostics aspects. // Vopr.virusologii 2008.

№ 4. 27-30.

8. Морозова О.В., Белявская Н.А., Матвеев Л.Э. Репликативный комплекс вируса клещевого энцефалита. II. Влияние белка оболочки Е и антител к нему на синтез РНК in vitro // Биоорган. химия. 1990. 16 (9): 1277-1279.

Morozova O.V., Belyavskaya N.A., Matveev L.E. Replicative complex of tick-borne encephalitis virus. II Influence of protein of membrane E and antibodies to it to RNA synthesis in vitro // Biorgan. Khimiya. 1990. V. 16. № 9. 1277-1279.

9. Грицун Т.С., Ляпустин Т.Н., Шаталов А.Г., Лашкевич В.А. Множественные формы белка NS1 как основного компонента невирионного («растворимого») антигена вируса клещевого энцефалита // Вопр. вирусологии. 1990. (6): 471-474.

Gritsun T.S., Lyapustin T.N., Shatalov A.G., Lashkevich V.A. Multiple forms of protein NS1 as main component of non-virion («dissoluble») antigen of tick-borne encephalitis virus/ Vopr. virusologii. 1990. № 6. P. 471-474.

10. Matveeva V.A., Popova R.V., Kvetkova E.A., Chernicina L.O. et al. Antibodies against tick-borne encephalitis virus (TBEV) non-structural and structural proteins in human sera and spinal fluid // Immunol. Lett. 1995. 46: 1-4.

11. Плохинский Н.А. Достоверность различия двух процессов // Биометрические методы. 1975. 48-76.

Plokhinski N.A. Reliability of two processes difference // Biometricheskie metody. 1975. 48-76.

12. Гублер Е.В. Информатика в патологии, клинической медицине и педиатрии. Л.: Медицина, 1990. 176.

Gubler E.V. Informatics in pathology, clinical medicine and pediatrics. L.: Meditsina, 1990. 176.

13. Лакин Б.Ф. Биометрия. М., 1990. 352.

Lakin B.F. Biometry. Moskva, 1990. 352.

14. Коненков В.И. Медицинская и экологическая иммуногенетика. Новосибирск: СО РАМН, 1999. 250.

Konenkov V.I. Medical and ecological immune genetics. Novosibirsk: SO RAMN, 1999. 250.

15. Сартакова М.Л., Коненков В.И. Структурные основы межклеточных взаимодействий в процессе представления антигенов Т-лимфоцитам: молекулы главного комплекса гистосовместимости как одна из составляющих частей тримолекулярного комплекса // Усп. совр. биол. 1997. 117 (5): 568-583.

Sartakova M.L., Konenkov V.I. Structural basis of intercellular interaction in the process of antigen representation to T-lymphocytes: molecules of the main complex of histocompatibility as a constituent part of three molecular complex. // Usp. sovr. biol. 1997. V. 117. Issue. 5. 568-583.

CLINICAL IMMUNOGENETICS OF ANTIVIRAL IMMUNE RESPONSE UNDER TICK-BORNE ENCEPHALITIS

Larisa Olegovna CHERNITSYNA¹, Vladimir Iosifovich KONENKOV²

¹ SI RI for regional pathology and pathomorphology of SB RAMS

2, Ac. Timakov str., Novosibirsk, 630117

² Institute of Clinical and Experimental Lymphology

2, akad. Timakov str., Novosibirsk, 630117

Immunologic and immunogenetic investigation of patients with tick-borne encephalitis has been carried out. Comparison between opposite groups divided by presence or absence of one or another immunogenetic marker in patient's phenotype, by antibody synthesis level allows revealing reliable associations between definite HLA-phenotype and strength of humoral immune response to different antigens of tick-borne encephalitis virus. HLA-B12 antigen associates with high level of IgM class specific antibodies to non-structural protein of NS1 virus of tick-borne encephalitis and HLA-DR7 associates with high positive dynamics of humoral immune response of antibodies of main classes (IgM and IgG) to non-structural protein NS1 of replicative complex of virus of tick-borne encephalitis. Others antigens: HLA-A4-for IgM-antibodies and HLA-A3 – for IgG-antibodies associate with lower level antibodies in dynamics of specific immune response to antigen E of tick-borne encephalitis virus's capsid and HLA-A28 antigen – with low level of IgG-antibodies to proteins E and NS1 of tick-borne encephalitis virus. Processes of synthesis of specific antibodies in indicated opposite groups proceeded in equal directions but significantly differed quantitatively.

Key words: tick-borne encephalitis, immune response, antigens of HLA complex.

Chernitsyna L.O. – candidate of Medical Sciences, head of laboratory of tick-borne infections of Department of regional problems of infectious pathology, e-mail: neuroinf@mail.ru

Konenkov V.I. – academician of RAMS, director of SI RI for regional pathology and pathomorphology of SB RAMS, head of laboratory of clinical immune genetics