

ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСОВ СЫВОРОТКИ БОЛЬНЫХ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ РАЗНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

Юлия Валерьевна Скибо^{1*}, Найра Шафкатовна Курмаева², Вера Николаевна Цибулькина², Ильшат Ганиевич Мустафин², Зинаида Ивановна Абрамова¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет,

²Казанский государственный медицинский университет

Реферат

Цель. Оценка содержания циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке больных лёгкой и тяжёлой формами atopической бронхиальной астмы.

Методы. В работе были использованы образцы сыворотки крови больных atopической бронхиальной астмой лёгкого персистирующего течения (30 человек) и тяжёлого персистирующего течения (20 человек). Группу контроля составили 15 практически здоровых добровольцев. Для выделения гигантских, крупных, средних и мелких иммунных комплексов из сыворотки использовали 3, 3,5, 4 и 7% полиэтиленгликоль-6000. Для количественной оценки иммунных комплексов измеряли плотность оптического поглощения в ультрафиолетовой области спектра при 280 нм. Для освобождения комплексов от иммуноглобулинов использовали протеин G-сепарозу. Определение белкового состава циркулирующих иммунных комплексов проводили методом электрофореза в 8% полиакриламидном геле.

Результаты. У больных бронхиальной астмой отмечено повышение концентрации циркулирующих иммунных комплексов по отношению к здоровым донорам. Установлено преобладание мелко- и среднедисперсных иммунных комплексов, содержание которых коррелировало с тяжестью астмы. Показано участие крупных, средних и мелких иммунных комплексов в иммунопатологических реакциях заболевания у больных как лёгкой, так и тяжёлой формой астмы. При этом коэффициент патогенности иммунных комплексов статистически значимо повышался в зависимости от тяжести заболевания. Электрофоретический анализ циркулирующих иммунных комплексов показал наличие белков с молекулярной массой 60 кДа в комплексах всех размеров. В группе с тяжёлой формой бронхиальной астмы в составе маломолекулярных комплексов установлено наличие фракции антигена с молекулярной массой 36 кДа.

Вывод. Выявленное повышение уровня циркулирующих иммунных комплексов мелких и средних размеров в сыворотке крови больных бронхиальной астмой может быть показателем предрасположенности этой категории больных к развитию аутоиммунных реакций.

Ключевые слова: циркулирующие иммунные комплексы, коэффициент патогенности, бронхиальная астма, атопия, аутоиммунитет.

THE CHARACTERISTICS OF SERUM CIRCULATING IMMUNE COMPLEXES OF PATIENTS WITH ATOPIC ASTHMA WITH DIFFERENT SEVERITY DEGREE Y.V. Skibo¹, N.S. Kurmaeva², V.N. Tsibulkina², I.G. Mustafin², Z.I. Abramova¹. *Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia, ²Kazan State Medical University, Kazan, Russia.*

Aim. To evaluate the serum level of pathogenic circulating immune complexes in patients with mild and severe atopical bronchial asthma. **Methods.** Serum samples of patients with atopical asthma of mild persistent (30 patients) and severe persistent (20 patients) forms were analyzed. The control group consisted of 15 healthy volunteers. To detect the giant, large, medium and small-sized serum immune complexes, 3, 3.5, 4 and 7% polyethyleneglycol-6000 solutions were used. For quantitative evaluation of the immune complexes we measured the ultraviolet optical density at 280 nm wave length. To separate the immune complexes from immunoglobulin, Protein-G-Sepharose was used. Determination of the protein composition of circulating immune complexes was performed by electrophoresis in 8% polyacrylamide gel. **Results.** The concentration of immune complexes was increased in patients with bronchial asthma compared to healthy donors. Small and medium-sized immune complexes were prevailing, their concentrations correlated with the severity of asthma. Large, medium and small-sized immune complexes participated in immunopathological reactions in patients with both mild and severe asthma, with immune complexes pathogenicity coefficient significantly increased depending on the severity of the disease. Electrophoretic analysis of circulating immune complexes has shown the presence of proteins with molecular weight of 60 kDa in the complexes of all sizes. In the severe asthma group, an antigen fraction with a molecular mass of 36 kDa within the small-sized molecular complexes was revealed. **Conclusion.** The observed increase of small and medium-sized circulating immune complexes serum levels in patients with bronchial asthma may be an indicator of these patients predisposal to autoimmune reactions development. **Keywords:** circulating immune complexes, pathogenicity coefficient, bronchial asthma, atopy, autoimmunity.

Концепция патогенеза бронхиальной астмы представляет его как воспалительный процесс, ведущий к развитию бронхиальной обструкции и повышенной гиперреактивности бронхов в ответ на различные стимулы [3, 5]. Иммунный ответ проявляется развитием клеточных и гуморальных реакций, включающих различные

клеточные элементы в зависимости от вида антигена, с обязательным участием антител. Одной из важнейших функций иммуноглобулинов является связывание антигена и образование иммунных комплексов. Образование последних должно завершаться нейтрализацией или элиминацией антигена, но при некоторых условиях иммунные комплексы могут фиксироваться в сосудах, инициируя воспаление.

Циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) представляют собой гетерогенную по размерам и составу антител и антигенов популяцию. При избытке тех или других генерируются мелкие комплексы, при их эквимолярных соотношениях формируются крупные комплексы с преобладанием антител [9]. ЦИК способны стимулировать развитие иммунного ответа организма. В норме эти комплексы быстро элиминируются из крови, но при длительном воздействии антигенов уровень ЦИК в крови повышается [7, 9]. Также повышение происходит и при заболеваниях, характеризующихся развитием аутоиммунных процессов [6, 11].

Один из существенных факторов, имеющих значение для проявления патогенности ЦИК, — их размер [8]. Наибольший патологический потенциал присущ растворимым иммунным комплексам средних размеров, сформированным при небольшом избытке антигена, способном активировать комплемент.

Дисфункция иммунной системы при бронхиальной астме может приводить к развитию аутоиммунных процессов, и в последнее время обсуждают возможную взаимосвязь между этими двумя состояниями [1, 5]. Всё больше сторонников находит концепция аутореактивности как одного из патогенетических механизмов развития атопических заболеваний. Существует ряд работ, подтверждающих участие аутоиммунных процессов в патогенезе бронхиальной астмы [10, 12].

Цель представленной работы — оценка содержания ЦИК в сыворотке больных лёгкой и тяжёлой формами атопической бронхиальной астмы.

В работе были использованы образцы сывороток больных атопической бронхиальной астмой ($n=50$) в возрасте от 19 до 45 лет, госпитализированных в пульмонологическое отделение Республиканской клинической больницы г. Казани. У 30 пациентов установлен диагноз атопической бронхиальной астмы лёгкого персистирующего течения, у 20 пациентов — атопической бронхиальной астмы тяжёлого персистирующего течения. Диагноз и степень тяжести верифицировали согласно критериям «Глобальной стратегии диагностики, профилактики и лечения астмы» (GINA, 2008). Группу контроля составили 15 практически здоровых добровольцев в возрасте от 20 до 34 лет (средний возраст 27 ± 7 года), которые не имели отягощённого аллергологического анамнеза, с отрицательными результатами кожных аллергических проб, уровнем иммуноглобулина Е менее 100 МЕ/мл, нормальными показателями функции внешнего дыхания.

Всем больным проводили общее клиническое обследование, включавшее общий анализ крови с подсчётом лейкоцитарной формулы, общий анализ мокроты, рентгенографию органов грудной клетки, электрокардиографию, исследование функции внешнего дыхания методом спирометрии (аппарат «АД ОЗ-М», Казань) с опре-

делением объёмных и скоростных параметров. Программа аллергологического обследования включала анализ аллергологического анамнеза, кожное тестирование с набором стандартных диагностических аллергенов (ОАО «Биомед» им. И.И. Мечникова Москва, ГП «Аллерген», Ставрополь), определение уровня общего и специфического иммуноглобулина Е в сыворотке крови методом твердофазного иммуоферментного анализа.

Выделение ЦИК. Образцы крови центрифугировали в течение 10 мин при 10 000 оборотах в минуту («Eppendorf», 5415R). На последующих этапах использовали сыворотку.

Выделение гигантских, крупных, средних и мелких ЦИК проводили осаждением 125 мкл сыворотки крови, разбавленной в 0,2 М боратном буфере, водородный показатель (рН) 8,6, — соответственно в 3, 3,5, 4 и 7% полиэтиленгликоле (6 кДа) в конечном объёме инкубационной смеси. После инкубации при 4 °С в течение 18–20 ч смесь центрифугировали в течение 10 мин при 3000 оборотах в минуту («Eppendorf», 5415R). Полученные осадки содержали разные по размеру фракции ЦИК, условно названные гигантскими (3%), крупными (3,5%) и средними (4%). К надосадочному раствору 3,5% полиэтиленгликоля добавляли 22% раствор полиэтиленгликоля в том же буфере до конечной концентрации 7%, инкубировали при 4 °С в течение 18–20 ч, а осадок, содержащий мелкие ЦИК, отделяли центрифугированием.

Для оценки количественного содержания ЦИК в сыворотке крови полученные осадки суспендировали в 0,1 М растворе NaOH и измеряли плотность оптического поглощения в ультрафиолетовой области спектра при 280 нм. Концентрацию ЦИК выражали в единицах оптической плотности при 280 нм.

Освобождение ЦИК от иммуноглобулинов. Сэфарозу перед употреблением уравнивали 0,5 мМ раствором этилендиаминтетрауксусной кислоты в 0,1 М фосфатном буфере, рН 6,5–7,5. Освобождение ЦИК от иммуноглобулинов и других белков, не входящих в состав комплексов, осуществляли преципитацией ЦИК с помощью протеин G-сэфарозы («Amersham-Pharmacia-Biotech», Швеция). К осадкам ЦИК добавляли 50 мкл 0,2 М боратного буфера, рН 8,6, суспендировали, далее добавляли 10 мкл максимально насыщенной суспензии сэфарозы и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. После инкубации смесь центрифугировали в течение 10 мин при 3000 оборотах в минуту («Eppendorf», 5415R), осадок промывали 3 раза тем же буфером, после чего элюировали чистую фракцию ЦИК 50 мкл 0,2 М глицина в 0,002 М растворе HCl, рН 2,2, центрифугировали в течение 10 мин при 3000 оборотах в минуту и брали надосадок с антигенами для последующего изучения белкового состава.

Определение белкового состава ЦИК. Белковый состав ЦИК определяли методом электрофо-

реза. Его проводили в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Гель, содержащий 8% акриламид, готовили с использованием 30% раствора акриламида и 0,8% раствора метиленбисакриламида. Буфер 8% геля содержал 0,375 М трис-НСl, 0,4% додецилсульфата натрия (рН 8,8). Электрофорез проводили в вертикальном направлении при силе тока 30 мА в электродном буфере следующего состава: 0,025М трис, 0,192 М глицин, 0,1% раствор додецилсульфата натрия (рН 8,3).

По окончании электрофореза гель фиксировали в 20% растворе этанола на 7% уксусной кислоте. После фиксации гель промывали и проводили окрашивание серебром.

Математический анализ полученных результатов проводили с использованием пакета программ Excel (Microsoft office 2007). Были использованы структурные характеристики (медиана, перцентили), а для оценки различий между отдельными выборками применяли непараметрические критерии Краскела-Уоллиса (для общей характеристик выборки) и Т-критерия Манна-Уитни (для парных сравнений различных выборок). Корреляционный анализ проводили методом ранговой корреляции Спирмена (r_s). Статистически значимыми считали различия при значениях двустороннего $p < 0,05$.

Проблема формирования и характер последующего течения бронхиальной астмы в патогенетическом плане в значительной степени связана с иммунологическими нарушениями. Вместе с тем диагностическая значимость отдельных

показателей иммунной системы остаётся недостаточно изученной, в частности при атопической форме бронхиальной астмы, и это в первую очередь касается ЦИК и их составляющих. Образование ЦИК – физиологический процесс, и в зависимости от состава они усиливают или угнетают иммунный ответ.

Известно, что размер ЦИК становится существенным фактором, имеющим значение для проявления их патогенных свойств [8, 9]. Низкомолекулярные комплексы хуже по сравнению с крупными комплексами активируют комплемент. Результат этого – их длительное присутствие в циркуляции и, как следствие, повышение вероятности отложения агрегатов в различных тканях [1, 8]. Таким образом, определяя размер ЦИК, можно косвенно оценивать их биологические свойства и возможные негативные последствия.

По этой причине на первом этапе исследования была проведена оценка содержания ЦИК в зависимости от их размера. Результаты показали, что у больных как лёгкой, так и тяжёлой формой заболевания наблюдается достоверное по сравнению с контролем повышение уровня мелких и средних ЦИК (рис. 1).

Большое диагностическое значение имеет коэффициент аутоиммунизации (K_A), предложенный Рудык и Барановским [1], который определяют по формуле:

При K_A , равном 1,5–4,0, считают доказанным участие иммунопатологических реакций в развитии заболевания.

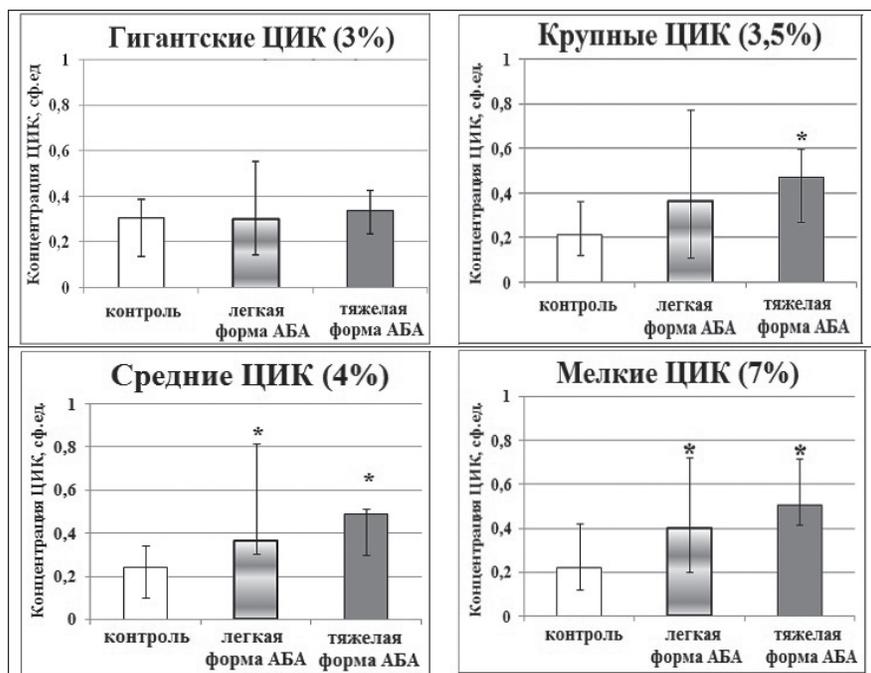


Рис. 1. Концентрация циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) гигантских, крупных, средних и мелких размеров в сыворотке крови здоровых доноров и больных лёгкой и тяжёлой формой атопической бронхиальной астмы (АБА). * $p < 0,05$ по сравнению с нормой.

$$K_A = \frac{C_{\text{ЦИК(исследуемой сыворотки)}}}{C_{\text{ЦИК(контроля)}}$$

Используя данную формулу, мы определили K_A у больных с лёгкой и тяжёлой формами астмы. При этом значение K_A возросло линейно с уменьшением размера ЦИК. При лёгком течении атопической бронхиальной астмы коэффициент K_A гигантских ЦИК составил 0,96, K_A крупных ЦИК – 1,6, K_A средних ЦИК – 1,51, K_A мелких ЦИК – 1,86.

При тяжёлом течении атопической бронхиальной астмы коэффициент K_A гигантских ЦИК составил 1,06, K_A крупных ЦИК – 2, K_A средних ЦИК – 2,03, K_A мелких ЦИК – 2,30.

Таким образом, вычисленные коэффициенты K_A у больных лёгкой и тяжёлой формами указывают на участие крупных, средних и мелких ЦИК в иммунопатологических реакциях.

Для определения содержания патогенных субфракций ЦИК был использован метод П.В. Стручкова [2], основанный на определении коэффициента размера ЦИК по формуле:

$$K = K_1 / K_2,$$

где K_1 и K_2 – концентрации гигантских и

средних ЦИК соответственно (рис. 2).

Результаты показали, что коэффициент патогенности достоверно повышается у больных бронхиальной астмой по отношению к контрольной группе.

Согласно данным литературы, при многих заболеваниях, характеризующихся нарушениями иммунного статуса, белковый (антигенный) состав ЦИК различен [2, 4]. Это приводит к необходимости идентификации соответствующих белковых компонентов.

На рис. 3 показана электрофореграмма гигантских, крупных, средних и мелких ЦИК больных лёгкой формой бронхиальной астмы до (а) и после (б) очистки. Для данной группы больных характерно наличие белков одной молекулярной массы (60 кДа) в комплексах всех размеров. Наибольшее количество обнаружено в крупных комплексах (3,5%).

В сыворотке крови больных тяжёлой формой атопической бронхиальной астмой обнаружены белки с молекулярной массой 60 кДа в крупных ЦИК (3,5%) и небольшое количество в мелких (7%). Также выявлена индивидуальная группа белков с молекулярной массой 36 кДа в составе мелких ЦИК (см. рис. 3г).

Таким образом, электрофоретический анализ ЦИК больных бронхиальной астмой показал наличие белков с молекулярной массой 60 кДа в комплексах всех размеров. В группе пациентов с тяжёлой формой бронхиальной астмы в составе мелкомолекулярных ЦИК установлено наличие фракции антигена с молекулярной массой 36 кДа.

ВЫВОДЫ

1. Проведённые исследования показали, что у больных атопической бронхиальной астмой происходит повышение концентрации циркулирующих иммунных комплексов по сравнению с относительно здоровыми людьми.

2. Отмечено преобладание мелко- и средне-дисперсных циркулирующих иммунных комплексов, степень уменьшения дисперсности коррелировала с тяжестью бронхиальной астмы.



Рис. 2. Изменение величины патогенности циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в группах контроля и больных лёгкой и тяжёлой формами атопической бронхиальной астмы (АБА). * $p < 0,05$ по сравнению с нормой.

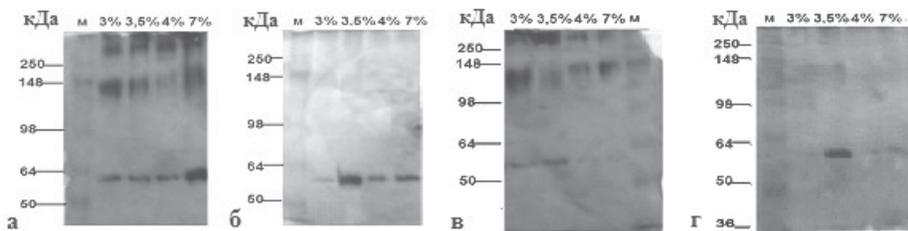


Рис. 3. Электрофореграммы белкового состава циркулирующих иммунных комплексов сывороток больных атопической бронхиальной астмой: а – белковый состав сыворотки крови больных лёгкой формой до очистки; б – белковый состав сыворотки больных лёгкой формой после очистки; в – белковый состав сыворотки больных тяжёлой формой до очистки; г – белковый состав сыворотки больных тяжёлой формой после очистки. Показано наличие индивидуальной фракции белков с молекулярной массой 36 кДа в группе с тяжёлой формой заболевания.

3. Выявленное повышение уровня циркулирующих иммунных комплексов мелких и средних размеров в сыворотке крови больных atopической бронхиальной астмой может быть показателем предрасположенности этой категории пациентов к развитию иммунопатологических реакций, что согласуется с литературными данными об ассоциации бронхиальной астмы с рядом аутоиммунных заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рудык Б.И., Барановский П.В. Сравнительная оценка изучения содержания иммунных комплексов при инфаркте миокарда, бронхиальной астме и ревматоидном артрите // Тер. арх. — 1984. — №10. — С. 17–19.
2. Стручков П.В., Константинова Н.А., Лаврентьев В.В., Чучалин А.Г. Скрининг-тест для оценки патогенных свойств циркулирующих иммунных комплексов // Лаб. дело. — 1985. — Т. 7. — С. 410–412.
3. Чучалин А.Г. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы. — М.: Атмосфера, 2008. — 108 с.
4. Bakunts G., Arakelyan A., Boyajyan A., Poghosyan A. Antigen composition of circulating immune complexes in

the blood of patients with hemorrhagic strokes // Westnik IAELPS. — 2001. — Vol. 6, N 42. — P. 97–99.

5. Buc M., Dzurilla M., Bucova M. Immunopathogenesis of bronchial asthma // Arch. Immunol. Ther. Exp. — 2009. — Vol. 57. — P. 331–344.
6. Cengic M., Rasic S. Importance of determination of circulating immune complexes in systemic lupus erythematosus // Med. Arch. — 2002. — Vol. 56. — P. 267–270.
7. Mackay I.R., Water J.V., Gershwin M.E. Autoimmunity: thoughts for the millennium // Clin. Rev. Allergy Immunol. — 2000. — Vol. 18, N 1. — P. 87–117.
8. Nangaku M., Couser W.G. Mechanisms of immune-deposit formation and the mediation of immune renal injury // Clin. Exper. Nephrol. — 2005. — Vol. 9. — P. 183–191.
9. Nezlin R.A. Quantitative approach to the determination of antigen in immune complexes // J. Immunol. Methods. — 2000. — Vol. 237. — P. 1–16.
10. Rottem M., Shoenfeld Y. Asthma as a paradigm for autoimmune disease // Int. Arch. Allergy Immunol. — 2003. — Vol. 132, N 3. — P. 210–214.
11. Voskuyl A.E., Hazes J.M., Zwiderman A.H. et al. Diagnostic strategy for the assessment of rheumatoid vasculitis // Ann. Rheum. Dis. — 2003. — Vol. 62, N 5. — P. 407–413.
12. Ye Y.M., Nahm D.H., Kim S.H. et al. Circulating autoantibodies in patients with aspirin-intolerant asthma: an epiphenomenon related to airway inflammation // J. Korean Med. Sci. — 2006. — Vol. 21. — P. 412–417.

УДК 618.39-021.3-091.1-055.26-055.27: 618.33-007: 575.224.23: 616-007

НО26

ВЗАИМОСВЯЗЬ НЕРАЗВИВАЮЩЕЙСЯ БЕРЕМЕННОСТИ С ХРОМОСОМНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ ПЛОДА

Наталья Владимировна Спиридонова¹, Ольга Борисовна Калинин^{1*},
Фрида Насыровна Гильмиярова¹, Ольга Игоревна Мелешкина²

¹Самарский государственный медицинский университет,

²Клиническая больница №5, г. Тольятти

Реферат

Цель. Изучение частоты хромосомных аномалий плода при неразвивающейся беременности.

Методы. Обследованы 328 женщин в возрасте 30,34±0,34 года при сроке гестации от 3 до 22 нед при неразвивающейся беременности. Диагноз неразвивающейся беременности был подтвержден при помощи ультразвукового исследования и определения содержания хорионического гонадотропина в крови. Проводили выскабливание полости матки с последующим цитогенетическим исследованием соскоба. Препараты для цитогенетического исследования получали по унифицированной методике — ускоренным прямым методом, идентификацию хромосом осуществляли после рутинного и дифференцированного окрашивания.

Результаты. У 88 женщин был установлен кариотип эмбриона. У 54 (61,4%) женщин ворсины хориона и плаценты эмбриона и плода, остановившихся в развитии, имели патологический набор хромосом, у 34 (63%) женщин — в I триместре беременности, у 20 (37%) женщин — во II триместре. Высокая частота выявления патологического кариотипа зарегистрирована при первой беременности у 29 (65,9%) женщин, во время второй и последующей беременности — у 26 (59,1%). Выявлены следующие виды патологии: аутомсомные трисомии — в 32 (59,3%) случаях, триплоидии — 8 (14,8%), моносомии X-хромосомы — в 6 (11,1%), полиплоидии — в 6 (11,1%), тетраплоидии — в 2 (3,7%). Остановка развития плода произошла впервые у 268 (81,7%) женщин, генетические аномалии в данной группе выявлены в 23 (52,3%) случаях. В группе женщин с наличием в анамнезе неразвивающейся беременности эмбрион и плод имели патологический кариотип в 34 (77,1%) случаях. Женский кариотип был обнаружен чаще мужского на 7,4%; 29 (53,7%) против 25 (46,3%) случаев. На 5–6-й неделе гестации элиминировались эмбрионы с полисомией (двойные, тройные трисомии) и триплоидией, на 6–7-й неделе — с трисомией 22, на 7–8-й неделе — с трисомией 18, на 8–9-й неделе — с моносомией X, на 10–11-й неделе — с трисомией 16. Связи изменений кариотипов плода с индексом массы тела беременной выявлено не было.

Вывод. Высокая частота трисомии так же, как и в случае с моносомией X, свидетельствует о большой популяционной частоте и высоком проценте самоэлиминации эмбрионов с данной патологией; наличие патологического кариотипа становится причиной для более раннего прерывания беременности.

Ключевые слова: неразвивающаяся беременность, кариотип плода, хромосомная патология, индекс массы тела.

ASSOCIATION OF MISSED MISCARRIAGE AND FETAL CHROMOSOMAL DISORDERS N.V. Spiridonova¹, O.B. Kalinkina¹, F.N. Gilmyarova¹, O.I. Meleshkina². ¹Samara State Medical University, Samara, Russia, ²Clinical Hospital

Адрес для переписки: maiorof@mail.ru