УДК: 612.017.1

Малежик Л.П., Малежик М.С., Нимаева Д.Ц.

АДАПТИВНЫЙ ИММУНИТЕТ ПРИ ОСТРОЙ РЕСПИРАТОРНОЙ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У ЧАСТО БОЛЕЮЩИХ ДЕТЕЙ НОСИТЕЛЕЙ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ (Asp299Gly) TOLL-4 И (Ser249Pro) TOLL-6 РЕЦЕПТОРОВ

ГБОУ ВПО Читинская государственная медицинская академия, г. Чита

Резюме: *В статье установлено, что количество иммуноглобулинов у детей, часто болеющих ОРВИ, определяется генотипами полиморфизма генов (Asp299Gly) Toll-4 и (Ser249Pro) Toll-6 рецепторов. При генетических дефектах в Asp299Gly Toll-4 рецептора снижен уровень IgA и sIgA у носителей генотипов Asp/Gly и Gly/Gly по сравнению с генотипом Asp/Asp. Концентрация IgM уменьшена у гетерозигот Asp299Gly и мутантных гомозигот генотипа Gly/Gly. В этих же группах больных детей снижен уровень IgG и его подклассов. При генетических изменениях в Toll-6 рецепторах концентрация IgA и sIgA значительно меньше у больных носителей генотипа Ser/Pro и мутантных гомозигот Pro/Pro, чем у генотипа Ser/Ser. Ограничен синтез IgM, IgG и его подклассов у генотипов Pro/Pro и Ser/Pro. Генетические нарушения в синтезе иммуноглобулинов при полиморфизме генов (Asp/299Gly) Toll-4 и (Ser249/Pro) Toll-6 рецепторов является одной из причин несостоятельности противовирусной защиты у детей, часто болеющих ОРВИ.*

Ключевые слова*: иммуноглобулины, ОРВИ, Toll-4 и Toll-6 рецепторы.*

L.P. Malezhik, M.S. Malezhik, D.T. Nimaeva

ADAPTIVE IMMUNITE| IN THE ACUTE VIRAL RESPIRATORY INFECTION OF THE CHILDREN WITH CHRONIC DISEASES, THE CARRIERS OF THE (ASP299GLY) TOLL-4 GENES POLYMORPHISM AND (SER249PRO) TOLL-6 RECEPTORS.

In the article is examined the role of polymorphisms of genes Toll-4 and Toll-6 receptor in the development of low antiviral defense of sickly children. It is shown that in the blood of children increases the content of IgM, IgG and its subclasses, and reduced the concentration of IgA. With genetic mutations in (Asp 299 Gly) Toll-4 and (Ser 249 Pro) Toll-6 receptors synthesis of explored immunoglobulins is reduced, it is regarded as one of the reasons for the low antiviral defense of the immune system of children with genetic defects in the signaling receptors.

Keywords: *immunoglobulins, SARS, Toll-4 iToll-6 receptors.*

Введение. В настоящее время общепризнанным является представление о том, что низкая противоинфекционная защита у детей, часто болеющих острой респираторной вирусной инфекцией связана с несостоятельностью врождённого и незрелостью адаптивного иммунитета [1, 2, 3, 7]. У таких детей наблюдается селективный дефицит Т и В-лимфоцитов, который отражается на уровне иммуноглобулинов. У часто болеющих детей в крови уменьшена концентрация IgG, IgM, IgA, sIgA [6,8]. Считают, что иммунологические нарушения могут носить как транзиторный характер, так и являться генетически обусловленным состоянием [9]. Поиск генетических основ высокой восприимчивости к вирусной инфекции находится в стадии становления и затрагивает в основном полиморфизм генов регуляторных цитокинов. Так, группой авторов [5] установлена связь между полиморфизмом генов Il-1β, TNF-α и повышенным риском острой патологии верхних дыхательных путей. У некоторых больных выявлена генетически обусловленная повышенная продукция провоспалительных медиаторов IL-1α и IL-1β, что ведёт к более выраженным симптомам воспаления и длительному течению [9, 10]. Нас интересовали генетические нарушения, связанные с кодированием Toll-рецепторов, которые экспрессируются практически на всех иммунокомпетентных клетках, распознают антигенный материал и индуцируют иммунный ответ [1, 10]. В более ранних исследованиях [3] нами было установлено, что среди часто болеющих детей 55,6% имеют генетический дефект в (Asp299Gly) Toll-4 рецептора и 70% генетические мутации в маркёре (Ser249Pro) Toll-6 рецептора. Лигандом для Toll-4 рецептора является ДНК вирусов, а для Toll-6 – ЛПС грамотрицательных бактерий. При нарушении в структуре этих рецепторов

возникает некачественный контакт патогенна и рецептора, что нарушает внутриклеточную сигнализацию и выработку в первую очередь цитокинов, являющихся регуляторами адаптивного иммунитета [4, 10]. Дефект в количестве и составе медиаторов, бесусловно, скажется на уровне иммуноглобулинов, определяющих антивирусную защиту. В связи с этим мы исследовали антителообразование в группе часто болеющих детей носителей генетических дефектов в Toll-4 и Toll-6 рецепторах.

Цель работы. Определить уровень IgA, sIgA, IgM, IgG и его подклассов в крови при ОРВИ у часто болеющих детей – носителей полиморфизма генов (Asp299Gly) Toll-4 и (Ser249Pro) Toll-6 рецепторов.

Материалы и методы исследования. Клиническую группу составили 190 детей обоего пола в возрасте от 1 года до 3 лет, часто болеющих острыми респираторными вирусными инфекциями. Из числа обследуемых детей в 49% был грипп, в 26% – парагрипп, в 5% – аденовирусная инфекция, в 4% – синцитиальный вирус. Критериями включения в исследования были: в анамнезе не менее 6 эпизодов ОРВИ, возраст пациентов от 1 до 3 лет, первые 3 дня заболевания.

В исследование не включали детей с хроническими бронхолёгочными заболеваниями (бронхиальная астма, рецидивирующий бронхит, пороки развития дыхательной системы, аллергические заболевания). Исследования проводились на базе НИИ медицинской экологии ГБОУ ВПО ЧГМА. Исследуемым материалом являлась венозная кровь.

В качестве популяционного контроля использовали выборку из 76 условно здоровых детей (30 мальчиков и 46 девочек) в возрасте от 1 года до 10 лет. Выделение ДНК осуществлялось при помощи наборов «ДНК-экспресс кровь» (НПФ «Литехс», Россия, Москва). Синтез использованных в работе олигонуклеотидных праймеров выполнен НПФ «Литехс», Москва. Выявление мутаций проводилось методом ПЦР. Концентрацию цитокинов выявляли методом твёрдофазного ИФА с использованием реагентов ТОО «Вектор-Бест» г. Новосибирск.

Исследования проводили на 90 больных ОРВИ детей с полиморфизмом генов Toll-4 (Asp299Gly) и 100 больных носителей полиморфизма Toll-6 (Ser249Pro) рецепторов. Все обследуемые были поделены на 7 групп: 1группа – здоровые дети, контроль (n=76); 2 группа – больные ОРВИ дети носители генотипа Asp/Asp (n=40) ; 3 группа – дети-носители генотипа Asp/Gly (n=18); 4 группа – носители генотипа Gly/Gly (n=32); 5группа – носители генотипа Ser/Ser (N=25); 6 группа – дети-носители генотипа Ser/Pro (n=50); 7-группа носители генотипа Pro/Pro (n=25).

Статистическая обработка материала проведена методом вариационной статистики с помощью пакетов программ Microsoft Excel 2007, STATISTICA 6,0. Перед началом анализа вариационные ряды тестировались на нормальность с использованием критерия Шапиро-Уилка W. При нормальном распределении использовался критерий Стъюдента (t-тест). Показатели оценивали в виде средних величин со стандартным отклонением (M±SD),$P<0,01$. При распределении признака, отличающемся от номального, применялся критерий Манна-Уитни (U-тест). Результаты представлены в виде медианы (Me [25-й;75-й перцентили] или среднего значения ± стандартное отклонение (M±SD). Статистически значимыми считали различия при $P<0,05$.

Результаты и обсуждение. В наших исследованиях установлено, что кровь, взятая в первые дни поступления детей в стационар, содержит высокую концентрацию IgM, IgG, и его подклассов IgG_1, IgG_3, IgG_4 (таблица 1).

Такая быстрая реакция В-лимфоцитов не может быть связана с формированием антигенспецифического клона. Скорее всего, в результате частого инфицирования у детей сохраняются клетки памяти, и при очередном попадании АГ уже имеющиеся антигенспецифичные клетки адаптивного иммунитета переходя в активированное состояние, продуцируют соответствующие иммуноглобулины. Возможно, часть иммуноглобулинов сохраняется в период ремиссии, и очередная респираторная инфекция начинается на этом фоне.

Однако концентрация IgA в первые дни ОРВИ у больных детей низкая, синтез sIgA не увеличивается, поэтому барьерная противовирусная защита у таких детей ослаблена (Табл.1).

Таблица 1

Содержание иммуноглобулинов в крови детей при ОРВИ (M±SD) (мг/мл)

Иммуноглобулины	Здоровые дети n=35	Больные ОРВИ n=60
IgA	3,2±0,6	1,51±0,2*
SIgA	1,41±0,1	1,51±0,2
IgM	1,3±0,11	2,3±0,3*
IgG	4,3±1,32	13,6±1,3*
IgG1	3,0±0,9	10,8±2,3*
IgG2	1,2±0,3	1,8±0,3
IgG3	0,3±0,7	1,3±0,2*
IgG4	0,3±0,6	1,16±0,2*

Примечание: *– значимость различий между показателями здоровых и больных детей (P<0,01).

Среди детей, часто болеющих ОРВИ, имеется группа с генетическим дефектом Toll-4 и Toll-6 рецепторов. Концентрация иммуноглобулинов у них определяется генотипом. Так, больные дети с полиморфизмом в гене Toll-4 рецептора имеют низкий уровень IgA во всех анализируемых вариантах (Табл.2). Синтез sIgA увеличен лишь у гомозигот генотипа Asp/Asp (гр.2). У гетерозигот (гр.3) и гомозигот (гр.4) в первые дни заболевания концентрация sIgA не изменяется.

Уровень IgM у больных независимо от генотипа в первые дни заболевания выше, чем в контроле (в контроле 1,3±0,1 мг/мл) (табл.2) У гетерозигот Asp299Gly (гр.3) и мутантных гомозигот Gly/Gly (гр.4) содержание этого иммуноглобулина снижено по сравнению с генотипом Asp/Asp.

Концентрация IgG высока при ОРВИ во всех группах больных независимо от наличия или отсутствия генетических проблем, однако в группе больных детей с полной заменой аллеля в гене кодирующим рецептор Toll-4 (Gly/Gly) синтез IgG несколько ограничен (15,2 мг/мл.) по сравнению с другими полиморфными вариантами (Табл.2)

Таблица 2

Содержание иммуноглобулинов у больных ОРВИ - носителей генотипов Asp299Gly в гене Toll-4 рецепторов (медиана, 25-75 перцентили) (мг/мл)

Иммуноглобулины	Здоровые дети (n=35) (1)	299Asp (n=40) (2)	Asp299Gly (n=18) (3)	299Gly (n=32) (4)
IgA	3,4 [2,7-4,7]	2,1 [1,2-2,8]	1,6*# [1,5-2,9]	1,4*# [1-2,1]
sIgA	1,4 [1,2-1,7]	3,4* [1-4,5]	1,5# [1,2-1,9]	1,6# [1,1-2]
IgM	1,3 [1,1-1,8]	2,4* [1,1-2,9]	1,7*# [1,1-2,3]	1,8*# [1,6-2,2]
IgG	4,3 [3,8-6,4]	17,3* [14,6-20,6]	16,6* [11,5-22,1]	15,2# [11-19]
IgG_1	3,0 [2,8-4,6]	15,3* [11-18,5]	14,8* [11,9-19,5]	16,0* [12,1-19]
IgG_2	1,2 [1-2,7]	2,3* [1,8-2,8]	1,9# [1,2-2,5]	1,7# [1,5-2,1]
IgG_3	0,3 [0,1-1,9]	1,3* [1-1,9]	1,6*# [0,8-1,9]	1,2* [1-1,8]
IgG_4	0,3 [0,1-1,8]	1,8* [1-2]	1,2*# [1,8-1,9]	1,1*# [1,1-1,7]

Примечание: U – критерий Манна Уитни; * – значимость различий по сравнению с контролем. # – значимость различий по сравнению с группой носителей Asp/Asp генотипа гена Toll-4 рецептора (P<0,05).

Высокое содержание IgG в основном связано с подклассом IgG_1, уровень которого во всех полиморфных вариантах гена Toll-4 в 5 раз превышает контрольное значение (Asp/Asp – 15,3 мг/мл; AspGly – 14,8; Gly/Gly -16,0 мг/мл).

Аналогичная динамика отмечена для IgG_3 и IgG_4, концентрация которых увеличена во всех анализируемых группах полиморфных аллелей гена Toll-4 рецептора.

Содержание IgG_2 у носителей мутантных гомозигот Gly/Gly и гетерозигот Asp/Gly оказалось ниже (1,7 мг/мл и 1,9 мг/мл), чем у обладателей генотипа Asp/Asp(2,3 мг/мл).

Более яркие дефекты в синтезе иммуноглобулинов обнаружены при генетических изменениях в гене Toll-6 рецептора (табл.3)

Концентрация антивирусного защитника IgA значительно меньше у больных носителей гетерозиготного варианта Ser249Pro (1,4 мг/мл) и мутантных гомозигот Pro /Pro (1,7 мг/мл), чем у гомозигот Ser/Ser (2,1 мг/мл).

Подобная аналогия отмечается и для sIgA. Аномальные варианты полиморфного гена Toll-6 имеют уровень sIgA 2,3 мг/мл и 2,4 мг/мл, что значительно ниже, чем у нормального генотипа Ser/Ser (3,4 мг/мл).

Таблица 3

Содержание иммуноглобулинов у больных ОРВИ - носителей генотипов Ser249Pro в гене Toll-6 рецепторов (медиана, 25-75 перцентили) (мг/мл)

Иммуногло-булины	Здоровые дети (n=35) (1)	249Ser (n=25) (5)	Ser249Pro (n=50) (6)	249Pro (n=25) (7)
IgA	3,4 [2,7-4,7]	2,1 [1,1-2,8]	1,4*# [1,1-2,9]	1,7*# [1-2,2]
sIgA	1,4 [1,2-1,7]	3,4* [1-4,3]	2,3*# [1,3-3,2]	2,4*# [1-2,7]
IgM	1,3 [1,1-1,8]	2,6* [1,2-3,6]	1,8# [1-2,2]	1,9# [1,6-2,3]
IgG	4,3 [3,8-6,4]	17,3* [13,6-21]	13,6*# [12-21,2]	12,2*# [11-18,3]
IgG_1	3,0 [2,8-4,6]	15,3* [9-17,2]	12,8*# [10,2-18]	10,0*# [9-18,4]
IgG_2	1,2 [1-2,7]	4,3* [2-5,2]	1,8*# [1,2-3,1]	1,4*# [1-2,2]
IgG_3	0,3 [0,1-1,9]	1,2* [1-1,7]	1,4* [1-1,8]	1,3* [0,9-1,6]
IgG_4	0,3 [0,1-1,8]	2,8* [0,9-3,5]	1,3*# [1,1-1,8]	1,2*# [1-1,6]

Примечание: U – критерий Манна Уитни; * – значимость различий по сравнению с контролем. # – значимость различий по сравнению с группой носителей Ser/Ser генотипа гена Toll-6 рецептора (P<0,05).

При генетических дефектах Toll-6 рецепторов ограничивается синтез IgG (гр.6,7) и становится ниже, чем у детей без аллельных замен в гене (гр.5) табл.3). Общий фон IgG определяется в основном IgG_1, содержание которого у мутантных гомозигот (10 мг/мл) меньше, чем у носителей генотипа Ser/Ser (15,3 мг/мл).

Ограничения в синтезе IgG_2 и IgG_4 отмечены у гомозигот носителей точечных мутаций в гене Toll-6 рецептора (генотип Pro/Pro).

Таким образом, проведенные исследования показали, что полиморфизм генов, кодирующих Toll-4 и Toll-6 рецепторы, сказывается на синтезе всех иммуноглобулинов (IgA, sIgA, IgM, IgG), концентрация которых изменяется при генетических дефектах в анализируе-

мых рецепторах. Возможно, генетические ограничения выработки антител являются одной из причин несостоятельности противовирусной защиты у часто болеющих детей.

Выводы:

1. При точечных мутациях в генах (Asp299Gly) Toll-4 рецептора снижен уровень IgA, sIgA, IgM, IgG, IgG2, IG4 в генотипах Asp/Gly и Gly/Gly по сравнению с генотипом Asp/Asp.
2. При генетических дефектах Toll-6 рецептора ограничен синтез IgA, sIgA, IgM, IgG, IgG1, IgG2, IgG4 в генотипах Ser/Pro и Pro/Pro по сравнению с генотипом Ser/Ser гена Ser249Pro Toll-6 рецептора.
3. Ограничения выработки антител при полиморфизме генов (Asp299Gly) Toll-4 и (Ser249Pro) Toll-6 рецепторов являются одной из причин несостоятельности противовирусной защиты у часто болеющих детей.

Литература:

1. Бондаренко В.М. Микробный фактор и Toll-подобные рецепторы в патогенезе атеросклероза / В.М. Бондаренко, В.Г. Лиходед // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2009. – №6. – С.107-110.
2. Карпова Н.И. Врождённый и адаптивный иммунитет при острой респираторной вирусной патологии у часто болеющих детей /Н.И. Карпова // Забайкальский мед. вестник. – 2011. – №2. –С. 66-69.
3. Карпова Н.И. Влияние полиморфизма генов Toll-4 (Asp299Pro) и Toll-6 (Ser249Pro) рецепторов на продукцию цитокинов у детей, часто болеющих острой респираторной вирусной инфекцией / Н.И.Карпова, Л.П. Малежик // Врач-аспирант. – 2011. – №6 (49). –С. 125-131.
4. Кладова О.В. Бактериальные лизаты у часто болеющих детей / О.В. Кладова, В.Л. Фомина // Детские инфекции. – 2009. – №3 – С. 48-53.
5. Макарова З.С. Выздоровление и реабилитация часто болеющих детей в школьных учреждениях / З.С. Макарова, Л.С. Голубева // Пособие для педагогов дошкольных учреждений. – М. Владос. – 2004. – 270с.
6. Ризванова Ф.Ф. Полиморфизм генов интерлейкина 1 и фактора некроза опухоли в патогенезе острой легочной патологии у детей / Ф.Ф. Ризванова // Казанский медицинский журнал. – 2010. – Т.91. -№5. – С. 594-598.
7. Романцов М.Г. Противовирусные препараты при респираторных заболеваниях у детей / М.Г Романцов, Ф.И. Ершов, Т.В. Сологуб // Российский педиатрический журнал. – 2010. – №6. – С.32-38.
8. Самсыгина Г.А. Проблемы диагностики и лечения часто болеющих детей на современном этапе / Г.А. Самсыгина, Г.А. Коваль // Педиатрия. – 2009. – №2. – С. 137-145.
9. Симбирцев А.С. Toll-белки: специфические рецепторы неспецифического иммунитета / А.С. Симбирцев // Иммунология. – 2005. – №6. – С.368-377.
10. Dinarello Ch. A Interleukin- 1β and the autoinflammary diseases /Ch. Dinarello // N. Engl. J. Med. – 2009. – Vol. 360 (23). – P. 2467-2470.