

Роль олигоклональных иммуноглобулинов G в патогенезе и диагностике хронических форм виллюйского энцефаломиелита

А.П. Данилова, Т.М. Сивцева, Ф.А. Платонов, В.А. Владимирцев

Показано, что у 18 из 20 больных с хроническими формами виллюйского энцефаломиелита в ЦСЖ обнаружены олигоклональные иммуноглобулины G. При определении специфичности к антигенам нейротропных вирусов установлено, что иммуноглобулины G проявляли иммунореактивность к вирусу простого герпеса 1 и 2 типа у 13 из 18 (72%) больных. Определено, что метод изоэлектрофокусирования с иммуноблоттингом имеет высокую степень чувствительности (90%) и специфичности (80%) и может использоваться при наличии клинических признаков болезни для диагностики хронического виллюйского энцефаломиелита. Представлено предположение об участии олигоклональных IgG в патогенезе заболевания.

Oligoclonal bands of IgG were detected in cerebrospinal fluid but not the serum in 18 of the 20 patients with definite VE. The presence of oligoclonal bands of IgG was examined using isoelectric focussing with immunoblotting. Further investigation showed that the oligoclonal bands of IgG in 13 of the 18 patients were immunoreactive against a mixture of Herpes Simplex 1 and 2 antigens. Using test have a high level of sensitivity (90%) and specificity (80%), may be helpful for diagnosis VE.

Несмотря на многолетние исследования, причина возникновения виллюйского энцефаломиелита (ВЭ) до сих пор точно не установлена, остаются неясными его этиология и патогенез, что затрудняет диагностику, лечение и профилактику. Существует несколько концепций развития ВЭ. Наиболее вероятной считается гипотеза вирусного происхождения ВЭ [1, 3, 7, 11]. Ряд исследователей высказывали мнение, что ВЭ является аутоиммунным заболеванием, связанным с нарушениями клеточного и гуморального иммунитета. Это подтверждается выявлением активированных иммунокомпетентных клеток и антител к антигенам мозгоспецифического белка [5, 8, 9, 12].

Диагноз ВЭ в настоящее время основывается на клинических проявлениях патологического процесса в центральной нервной системе (ЦНС). Симптомы ВЭ достаточно характерны, но не специфичны. Специфических тестов для диагностики ВЭ, за исключением своеобразного клинического течения заболевания и типичных патоморфологических изменений, пока нет. Ис-

пользование различных нейрофизиологических и иммунологических методов позволяет только подтвердить клинический диагноз ВЭ. Представляется актуальным исследование олигоклональных иммуноглобулинов G (IgG) в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) и их специфичности с использованием метода изоэлектрофокусирования с иммуноблоттингом у больных с ВЭ для понимания патогенетических механизмов и совершенствования лабораторной диагностики ВЭ.

Цель работы: определить роль олигоклональных иммуноглобулинов G в патогенезе и диагностике хронических форм виллюйского энцефаломиелита.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Исследование олигоклональных иммуноглобулинов G с определением их специфичности у больных с достоверным диагнозом хронической формы виллюйского энцефаломиелита.

2. Оценка возможности использования метода изоэлектрофокусирования с иммуноблоттингом для диагностики хронического виллюйского энцефаломиелита.

Материалы и методы

Обследовано 20 больных с хронической формой ВЭ, из них 7 (35%) женщин и 13 (65%)

ДАНИЛОВА Альбина Прокопьевна – невролог ИЗ АН РС(Я); СИВЦЕВА Татьяна Михайловна – к.б.н., с.н.с. ИЗ АН РС(Я); ПЛАТОНОВ Федор Алексеевич – д.м.н., зам. директора по научно-клинической работе ИЗ АН РС(Я); ВЛАДИМИРЦЕВ Всеволод Афанасьевич – к.м.н., зав. отделом ИЗ АН РС(Я).

мужчин, якутской национальности, с продолжительностью болезни от 3 до 34 лет. Средняя продолжительность болезни для всей группы составила $20,4 \pm 7,9$. Средний возраст к началу заболевания для всей группы составил $32,7 \pm 6,5$ лет, средний возраст к моменту осмотра равен $53,5 \pm 11,1$ лет. Из 20 больных с дементно-паретической формой (ДПФ) было 5 (25%), с спастико-паретической формой (СПФ) – 15 (75%).

Контрольные иммунологические исследования были выполнены в группе из 15 больных – лиц якутской национальности, страдающих различными заболеваниями ЦНС. Данную контрольную группу разделили на две подгруппы. В первую из них вошли 10 человек с невоспалительными неврологическими заболеваниями ЦНС, протекающими с нормальной по содержанию белка и данным цитологического исследования ЦСЖ – боковым амиотрофическим склерозом, спастической параплегией, хореоакантоцитозом, энцефалопатиями различного генеза, острым нарушением мозгового кровообращения (геморрагическим или ишемическим инсультом, субарахноидальным кровоизлиянием). Вторую контрольную группу составили 5 человек с воспалительными болезнями ЦНС: отогенным менингитом, стволовым энцефалитом неясной этиологии и герпетическим энцефалитом. Средний возраст для всей контрольной группы составил $47,7 \pm 18,3$ лет.

Для иммунологических исследований у обследуемых одновременно производился забор венозной крови в количестве 10 мл и ликвора в количестве 5 мл. В экспедиционных условиях собранный материал замораживали в жидком азоте. Все больные лечились в разное время в клиническом отделе ИЗ АН РС (Я). Всем больным при поступлении в стационар проводилось клинико-неврологическое обследование и МРТ-исследование головного мозга. Диагноз хронический ВЭ ставился на основании диагностических критериев, принятых в настоящее время [6]. Ведущими клиническими симптомами в соответствии с рекомендациями являются прогрессирующие двигательные нарушения нижних конечностей, речевые и интеллектуально-мнестические нарушения. Наряду с изменениями со стороны ЦНС диагностически важными являются рентгенологические признаки: атрофия головного мозга, выраженная гидроцефалия [2, 4].

Лабораторная диагностика IgG в ЦСЖ и сыворотке крови осуществлялась путем разделения белков методом изоэлектрофокусирования в агарозе с последующим иммуноблоттингом. Все

этапы методики описаны подробно в статье G. Kear [14]. Диагностическим критерием интратекстального, т.е. локального синтеза IgG, было выявление описанным методом олигоклональных полос (бэндов) на электрофореграмме. Результат оценивался как положительный при выявлении олигоклональных полос (более 2 полос) на электрофореграмме только в ЦСЖ при отсутствии их в параллельно исследованной сыворотке крови. При отсутствии полос в ЦСЖ и сыворотке результат оценивался как отрицательный. Выявление полос в ЦСЖ указывает на повышенный синтез иммуноглобулина определенными клонными активированными плазматическими клетками в пределах ЦНС.

Для определения специфичности олигоклональных IgG применялся метод иммуноблоттинга. Применялись наборы со смесью антигенов вирусов простого герпеса (ВПГ) 1 и 2 типов, цитомегаловируса и вируса варицелла-зостер производства фирмы Virion (Швейцария). На наличие ВПГ 1 и 2 типов были обследованы 15 проб ДНК крови, 9 проб ЦСЖ и ткани головного мозга одного умершего больного. Молекулярно-генетическая диагностика ВПГ проводилась методом ПЦР с использованием наборов видоспецифических праймеров.

Биометрический анализ осуществлялся с использованием пакетов Statistica 6.0 и Excel 7.0. До проверки гипотез равенства средних групповых значений проводилась проверка нормальности распределения количественных признаков отдельно для каждой сравниваемой группы с использованием критерия Колмогорова–Смирнова с поправкой Лиллиефорса и критерия Шапиро–Уилка. Средние выборочные значения количественных признаков приведены в тексте в виде $M \pm m$, где M – среднее выборочное, m – ошибка среднего. В связи с тем, что распределение анализируемых признаков не подчинялось законам нормального распределения, при сравнении средних групповых количественных признаков в группах использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Для выявления связи наличия олигоклональных IgG от длительности болезни использован ранговый корреляционный анализ по Спирмену. Для анализа связи двух качественных признаков между собой применялся анализ таблиц сопряженности, статистическую значимость различий определяли с учетом критерия Фишера, достигнутого уровня значимости (p). Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости « p » принимался равным 0,05.

Для оценки диагностической эффективности метода изофокусирования определялись его чувствительность и специфичность, прогностическая значимость отрицательного и положительного результата по общепринятой методике с использованием четырехпольной таблицы сопряженности [10].

Результаты и обсуждение

Полученные результаты показали, что у большинства больных с хронической формой ВЭ (у 18 из 20) в ЦСЖ имелись олигоклональные IgG. В контрольной группе положительная иммунная реакция наблюдалась только в 3 случаях из 15 (табл.1).

При сравнительном анализе данных иммунологического исследования заметно, что цифры положительного результата на наличие олигоклональных IgG значительно выше у больных с диагнозом хронический ВЭ, чем у больных с другими неврологическими заболеваниями (табл.1). Статистический анализ показал наличие статистически значимого различия в частоте положительного результата между группой больных ВЭ и контрольной группой ($\chi^2=14,7$, $p=0,001$).

Мы сравнили группу больных ВЭ, имеющих положительный результат на наличие олигоклональных IgG, с группой больных ВЭ, у которых этот результат был отрицательным. Клиническая характеристика сравниваемых групп больных ВЭ представлена в табл. 2.

При анализе продолжительности болезни пациентов установлено, что в подгруппе, имеющих

положительный результат, средняя продолжительность заболевания составила $19,3 \pm 7,5$, в подгруппе с отрицательным результатом – $29,5 \pm 6,4$. При сравнении средних значений длительности болезни с применением U-критерия Манна–Уитни между этими группами пациентов статистически значимых различий не выявлено ($p=0,084$). Полученные данные статистического анализа показали, что выявляемость олигоклональных IgG статистически значимо не имела зависимости ни от пола ($p=0,589$), ни от клинической формы ($p=0,552$), ни от длительности болезни ($r=0,41$, $p=0,083$). Наличие патологических изменений по данным ЯМР-томографического исследования, а также клинических и лабораторных признаков поражения ЦНС, характерных для ВЭ, свидетельствовали в пользу воспалительного заболевания. Можно лишь сказать о некоторой разнице у одного больного в длительности заболевания (34 года). Отрицательный результат на наличие олигоклональных IgG может быть обусловлен истощением иммунной системы. Олигоклональные IgG не выявлены у другой больной с длительностью болезни 25 лет, с регрессирующим типом течения ВЭ. Учитывая то, что эта группа наблюдения состоит из одного человека, трудно сделать анализ зависимости от типа течения этой группы. Скорее всего, этот факт можно объяснить относительно доброкачественным течением этого типа ВЭ, которая не сопровождается активной работой иммуннопатологических механизмов.

Учитывая то, что ВЭ является прогрессирующим заболеванием, мы детально исследовали зависимость наличия изучаемого феномена от длительности заболевания. Положительные результаты отмечены у пациентов с различными длительными сроками болезни от 3 до 31 года. Обнаружение олигоклональных IgG у большинства пациентов с продолжительными сроками болезни, по-видимому, можно объяснить тем, что активность иммуннопатологического процесса длительное время сохраняется.

Таким образом, сравнительный анализ показал, что ни с одним из исследуемых качественных и количественных признаков, которые могли повлиять на течение основного заболевания, сравниваемые подгруппы больных с диагнозом ВЭ статистически значимо не различались.

Положительные результаты на наличие олигоклональных IgG отмечены у трех из пяти больных с другими воспалительными заболеваниями ЦНС: у одного больного с диагнозом герпетический энцефалит, у одного с диагнозом

Таблица 1

Частота обнаружения олигоклональных IgG у больных хроническим ВЭ и в контрольной группе

Результаты тестирования	Группы больных	
	ВЭ	Контроль
Положительный	18	3
Отрицательный	2	12

Таблица 2

Клиническая характеристика и частота наличия олигоклональных IgG больных ВЭ

Клинические показатели	Положительный результат	Отрицательный результат
Мужчины	12 (92%)	1 (8%)
Женщины	6 (86%)	1 (14%)
СПФ	13 (87%)	2 (13%)
ДПФ	5 (100%)	
Средний возраст к моменту осмотра	$52,6 \pm 11,3$	$61,5 \pm 3,5$
Средняя продолжительность болезни	$19,3 \pm 7,5$	$29,5 \pm 6,4$

отогенный менингит, у одного с диагнозом стволовой энцефалит неясной этиологии. Низкая частота (20%) таких изменений у пациентов с другими воспалительными неврологическими заболеваниями подчеркивает их значимость в диагностике ВЭ. Содержание их отмечалось на стадии выраженных клинических проявлений заболевания, когда диагноз не вызывал сомнений. Согласно литературным данным, воспалительные заболевания ЦНС сопровождаются активацией локального иммунного ответа мозга, что должно проявляться появлением олигоклональных IgG в ЦСЖ [13, 15].

Статистический анализ показал, что использованный тест имеет достаточно высокую степень чувствительности (90%) и специфичности (80%), что подтверждает его диагностическую ценность при ВЭ. Прогностичность отрицательного результата, определяющая вероятность отсутствия заболевания при отрицательном результате высока (85%), поэтому можно сделать вывод, что отрицательные результаты теста позволяют исключить наличие заболевания. Поскольку прогностичность положительного результата, указывающая на вероятность заболевания при положительном результате высока (85%), положительные результаты на наличие олигоклональных IgG дают возможность подтвердить предполагаемый диагноз. Следовательно, данный лабораторный метод определения иммуноглобулинов G интратекального происхождения может быть использован для диагностики ВЭ.

При определении специфичности к антигенам нейротропных вирусов установлено, что иммуноглобулины G интратекального происхождения проявляли иммунореактивность к ВПГ у 13 из 18 (72%) больных с диагнозом ВЭ. В то же время иммунореактивность к двум другим исследованным антигенам вируса не выявлена. При молекулярно-генетической диагностике вирус простого герпеса не обнаружен.

Итак, у большинства (90%) больных с диагнозом ВЭ нами обнаружены положительные результаты на наличие олигоклональных IgG. Обнаружение олигоклональных IgG в ЦСЖ свидетельствует о наличии местного интратекального синтеза при ВЭ. Результаты иммунологических исследований больных с диагнозом ВЭ позволили выдвинуть нижеописанную гипотезу об участии олигоклональных IgG в патогенезе заболевания. Нами обнаружено, что ЦСЖ больных с ВЭ содержит IgG – вирусспецифические анти-

тела олигоклональной природы, что дало возможность утверждать об активации местного иммунитета, сопровождающегося повышенной продукцией антител. Присутствие антител может свидетельствовать об ответной реакции иммуннокомпетентной системы самого мозга к вирусам. Отсюда следует, что вирус является как источник повреждающего антигена. Исходя из этого, можно предположить, что при ВЭ формируется и поддерживается персистенция вируса, которая и определяет противовирусный иммунитет. Поэтому можно высказать предположение, что действие вируса при ВЭ своеобразно, вирус оказывает стимулирующее, а не цитодеструктивное действие как при других вирусных энцефалитах. Вероятно, этот вирус лишь запускает каскад иммунопатологических реакций, в результате чего образуются аутоантигены, которые провоцируют аутоиммунное разрушение собственных тканей мозга. По нашему мнению, допускается развитие заболевания под влиянием внешнего фактора вируса с последующим вовлечением аутоиммунных механизмов. Тем более это подтверждается данными других авторов, показавших, что ВЭ – аутоиммунное заболевание [5, 8, 9, 12].

Обнаружение антител, специфичных к ВПГ у больных с диагнозом ВЭ, дало основание нам говорить об участии персистирующей герпесной инфекции в патогенезе ВЭ. Прямого доказательства присутствия вируса простого герпеса нами не получено, поэтому является ли этот вирус этиологическим агентом при ВЭ в настоящее время трудно сказать. Возможно, вирус элиминируется, либо сохраняется в неактивной форме в небольших количествах, который трудно выявить использованными методами диагностики.

Выводы

1. В цереброспинальной жидкости больных с хроническими формами ВЭ обнаружены олигоклональные иммуноглобулины G интратекального происхождения, специфичные к вирусу простого герпеса 1 и 2 типов.

2. Обнаружение олигоклональных иммуноглобулинов G в цереброспинальной жидкости с использованием метода изоэлектрофокусирования с иммуноблоттингом может служить дополнительным диагностическим критерием хронической формы виллюйского энцефаломиелита у больных при наличии клинических признаков болезни.

Литература

1. Авцын А.П., Прохорова И.А. Патоморфологические изменения в ЦНС при виллюйском энцефаломиелите // Вирусы и вирусные инфекции человека. – М., 1981. – С. 208–209.
2. Баранов В.А. Пневмоэнцефалографические исследования при виллюйском энцефалите (энцефаломиелите) // Актуальные проблемы вирусологии и профилактики вирусных заболеваний. – М., 1972. – С. 201–202.
3. Владимирцев А.И., Петров П.А., Дубов А.В. и др. Клинико-эпидемиологическая характеристика виллюйского энцефалита // Особенности патологии коренного и пришлого населения в условиях Севера. – Красноярск, 1981. – Т. 2. – С. 190.
4. Николаева Т.Я., Никитина Р.С., Фарафонова Е.Н. и др. Клинико-томографические сопоставления при виллюйском энцефалите и других органических поражениях ЦНС // Виллюйский энцефаломиелит: Матер. 1-й Международной науч.-практ. конф. – Якутск, 1996. – С. 74–75.
5. Осаковский В.Л. Иммунопатология виллюйского энцефаломиелита // Виллюйский энцефаломиелит: Матер. 1-й Международной науч.-практ. конф. – Якутск, 1996. – С. 124–126.
6. Тазлова Р.С. Виллюйский энцефаломиелит (клиника, психические нарушения, вопросы дифференциального диагноза). – Якутск, 1992. – 15 с.
7. Петров П.А., Владимирцев А.И. Распространенность виллюйского энцефалита в Якутской АССР // Проблемы развития производительных сил Якутской АССР. – Якутск, 1969. – С. 99–101.
8. Федоров А.И., Осаковский В.Л. Иммунология виллюйского энцефаломиелита // Проблемы виллюйского энцефаломиелита, нейродегенеративных и наследственных заболеваний нервной системы: Тез. докл. 2-й Международной науч.-практ. конф. – Якутск, 2000. – С. 65–67.
9. Фефелова В.В., Николаева Т.Я., Владимирцев В.А. Изучение распределения генетических маркеров системы HLA в связи с проблемой виллюйского энцефалита // Виллюйский энцефаломиелит: Матер. 1-й Международной науч.-практ. конф. – Якутск, 1996. – С. 122–123.
10. Флетчер Р., Флетчер С., Вагнер Э. Клиническая эпидемиология. Основы доказательной медицины / Пер. с англ. – М.: Медиа Сфера, 1998. – 352 с.
11. Чумаков М.П., Петров П.А., Сарманова Е.С. и др. Изучение эпидемиологии виллюйского энцефаломиелита в Якутской АССР // Актуальные проблемы вирусологии и профилактики вирусных заболеваний: Тез. докл. XVII науч. сес. Ин-та полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР. – М., 1972. – С. 238–240.
12. Шатунов А.Ю., Алексеев В.П., Аутишилус А.И. Аутоиммунный компонент у коренного населения Якутии, проживающего в очагах распространения патологии ЦНС // Актуальные вопросы здоровья населения Республики Саха (Якутия). – Якутск, 1994. – С. 140–144.
13. Andersson A., Alvarez-Cermenio J., G. Bernardi et al. The role of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. – 1994. – №7. – P. 897–903.
14. Keir G., Luxton P.W., Thomson E.J. Isoelectric focusing of cerebrospinal fluids immunoglobulin G. // Ann. Clin. Biochem. – 1990. – №27. – P. 436–443.
15. Thompson E.J., Keir G. Laboratory investigation of cerebrospinal fluid proteins / Ann. Clin. Biochem. 1990. – № 27. – P. 425–435.



УДК 14.00.09

Эпидемиология и факторы риска развития бронхиальной астмы у детей на Севере

О.Н. Иванова, П.Г. Петрова, Н.Н. Барашкова

Проблема аллергических заболеваний (АЗ) легких у детей в настоящее время весьма актуальна. Пристальное внимание к ней педиатров объясняется распространенностью аллергических заболеваний, нередким развитием у детей острых аллергических состояний, требующих неотложной терапевтической помощи, существенным влиянием аллергических реакций на течение других патологических процессов. Бронхиальная астма (БА) – наиболее тяжелая и опасная в прогностическом отношении аллергическая патология лег-

ИВАНОВА Ольга Николаевна – к.м.н., ст. препод. МИ ЯГУ; ПЕТРОВА Пальмира Георгиевна – д.м.н., проф., ректор МИ ЯГУ; БАРАШКОВА Нина Николаевна – к.м.н., доцент, зав. каф. МИ ЯГУ.