

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

УДК 616.9-022.6:575.224.234:612.017

ПАВЛОВ
Кирилл Игоревич

**СОСТОЯНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ
МЕХАНИЗМОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ ИММУНОГЕНЕЗ
ПРИ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ
ЧЕЛОВЕКА**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

Минск 2018

Научная работа выполнена в учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет»

Научный руководитель: **Титов Леонид Петрович**, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки Республики Беларусь, член-корреспондент Национальной академии наук Беларуси, иностранный член Российской академии наук, заведующий лабораторией клинической и экспериментальной микробиологии государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»

Официальные оппоненты: **Федорович Сергей Владимирович**, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки Республики Беларусь, главный научный сотрудник лаборатории комплексных проблем гигиены пищевых продуктов республиканского унитарного предприятия «Научно-практический центр гигиены»

Генералов Игорь Иванович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой клинической микробиологии учреждения образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

Оппонирующая организация: государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

Защита диссертации состоится 21 июня 2018 года в 14.30 на заседании совета по защите диссертаций Д 03.18.04 при учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет» по адресу: 220116, г. Минск, пр-т Дзержинского, 83, e-mail: uchsovet@bsmu.by, телефон 277-16-21.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет».

Автореферат разослан «___» мая 2018 года

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций Д 03.18.04,
кандидат медицинских наук, доцент



А. П. Музыченко

ВВЕДЕНИЕ

В общей структуре инфекционных заболеваний человека на долю вирусных инфекций неизменно приходится более 90% случаев [Гендон Ю. З., 2000; Малкоч А. В. и соавт., 2008; Лобзин Ю. В. и соавт., 2015]. Вирусы являются как внутриклеточными, так и внуригеномными инфекционными агентами. Многие патогены вирусной природы реализуют стратегию генома посредством прямого и/или опосредованного воздействия на совокупность генов иммунной системы (иммунном) человека, что способствует хронизации заболевания и онкогенной трансформации [Perise-Barrios A.-J. et al., 2012; Nagata K. et al., 2017]. Такие распространенные и актуальные для медицины инфекционные агенты, как вирус гепатита С (ВГС), вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) и вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ), вирус герпеса человека 6-го типа (ВГЧ-6) обладают механизмами воздействия на иммуногенез, оказывая влияние на формирование антигенраспознающих рецепторов лимфоцитов [Титов Л. П. и соавт., 2010; Russi S. et al., 2015; Kalchschmid J. S. et al., 2016]. В реализации механизмов специфического иммунитета в ответ на антигены вирусов выделяют два этапа – соматическую рекомбинацию генов иммуноглобулинов и созревание аффинности антител [Muramatsu M. et al., 2000; Chiu, Y.-L. Greene W. C., 2009]. Соматическая рекомбинация осуществляется за счёт реаранжировок в геноме В-лимфоцитов, кодирующих группы сцепления генов лёгких и тяжёлых цепей иммуноглобулинов [Matsuda F. et al., 1998]. Созревание аффинности антител происходит, преимущественно, путём соматических гипермутаций в переменном регионе (FR1-JH) генов тяжёлых цепей иммуноглобулинов, детерминируемых активностью фермента цитидиндезаминазы (ЦДА). ЦДА относится к энзиматическим регуляторам иммунного ответа, участвующим на всех стадиях его формирования, крайне чувствительным к внешним и внутренним сигналам [Zan H., Casali P., 2013, 2015]. К энзимам, вызывающим модификацию свободных нуклеозидов, принадлежит и аденозиндезаминаза (АДА). В научной литературе ЦДА и АДА характеризуют как иммуноферменты [Титов Л. П. и соавт., 2012].

Данные процессы при вирусных заболеваниях изучены недостаточно. В предшествующих исследованиях отсутствует единообразное представление об уровне активности и диапазоне индивидуальной изменчивости ЦДА у здоровых лиц [Thompson P. W., 1986; Okamura T., 1994; Abdulsamie H. et al., 2004]. В энзиматических базах данных не представлены значения активности ЦДА при вирусных инфекциях, сопровождаемых нарушением иммуногенеза. Оценка состояния процессов соматических рекомбинаций и активности иммуноферментов ЦДА и АДА представляются перспективными направлениями в диагностике функционирования иммунной системы пациентов с острыми и хроническими вирусными инфекциями.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами (проектами), темами

Диссертация выполнена в рамках темы НИОК(Т)Р кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет» «Молекулярно-генетические основы вирулентности и резистентности микроорганизмов к противомикробным препаратам и их взаимодействия с компонентами иммунной системы при инфекционных и неинфекционных заболеваниях» (№ госрегистрации 20121625 от 11.05.2012 г.). Исследования пациентов с диагнозом острого инфекционного мононуклеоза проводились в рамках выполнения ГПНИ «Новые технологии диагностики, лечения и профилактики» 2013–2015 гг., по заданию 03.09 «Установить предикторы хронизации и затяжного течения инфекции, вызванной вирусом Эпштейна–Барр с целью коррекции патогенетической терапии» (№ госрегистрации 20142762 от 29.10.2014 г.).

Цель и задачи исследования

Цель исследования – установление закономерностей молекулярно-генетических механизмов, связанных с соматической рекомбинацией генов тяжёлых цепей иммуноглобулинов и активностью иммуноферментов ЦДА и АДА при ВИЧ-инфекции, ВГС-инфекции, ВГЧ-6-инфекции, ВЭБ-инфекции (острый инфекционный мононуклеоз и латентное носительство).

Задачи исследования:

1. Охарактеризовать состояние соматической рекомбинации генов тяжёлых цепей иммуноглобулинов популяций мононуклеарных лейкоцитов периферической крови (МПК) здоровых лиц и пациентов с вирусными инфекциями, сопровождающимися нарушением процессов иммуногенеза.

2. Оптимизировать методику определения ЦДА, используя образцы крови и спленоцитов линейных мышей C57BL/6. Исследовать значения активности ЦДА сыворотки крови здоровых лиц в зависимости от пола, возраста, параметров реакции и типа используемого субстрата, содержания В-лимфоцитов, активности АДА, состояния соматической рекомбинации генов тяжёлых цепей иммуноглобулинов.

3. Оценить уровень активности ЦДА и АДА сыворотки крови пациентов при вирусных инфекциях, сопровождающихся нарушением процессов иммуногенеза (ВИЧ-инфекция, вирусный гепатит С, острый инфекционный мононуклеоз (ИМ), ВГЧ-6-инфекция).

4. Оценить экспрессию генов иммунной системы МПК человека и В-лимфоцитов линии Daudi, имеющих латентное носительство ВЭБ.

Объект исследования: сыворотки крови здоровых лиц и пациентов с вирусными инфекциями, МПК, продукты реаранжировок в генах тяжёлых цепей иммуноглобулинов здоровых лиц и пациентов с вирусными инфекциями, плазма и спленоциты линейных мышей C57BL/6, гены иммунной системы МПК и В-лимфоцитов линии Daudi.

Предмет исследования: состояние молекулярно-генетических механизмов, контролируемых иммуногенез, обусловленных соматической рекомбинацией генов тяжёлых цепей иммуноглобулинов и активностью иммуноферментов ЦДА и АДА; видоизменение экспрессии генов иммунной системы В-лимфоцитов при латентном носительстве ВЭБ.

Научная новизна

Впервые охарактеризована гетерогенность соматической рекомбинации генов тяжёлых цепей иммуноглобулинов в поликлональных популяциях МПК здоровых лиц, пациентов с ХВГС и острым ИМ. Выявлено 2 варианта генных реаранжировок: первый вариант характеризуется преобладанием фрагментов, равных по длине полному продукту соматической рекомбинации FR1-JH (300–390 н.п.), второй вариант характеризуется равномерным соотношением продуктов в диапазоне от 200 н.п. до 390 н.п. Первый вариант выявляется преимущественно в популяциях МПК здоровых лиц, второй вариант характерен для пациентов с ХВГС и острым ИМ.

Впервые выявлено снижение активности иммуноферментов ЦДА и АДА сыворотки крови пациентов с ВГС-инфекцией и ВГЧ-6-инфекцией в сравнении со здоровыми лицами. Впервые выявлено, что активность АДА сыворотки крови выше ($17,39 \pm 2,42$ МЕ/л) у ВИЧ-инфицированных пациентов с высокой (более 100 000 копий/мл) и средней (10 000–100 000 копий/мл) вирусной нагрузкой, чем у пациентов с низкой вирусной нагрузкой (менее 10 000 копий/мл) ($11,4 \pm 1,06$ МЕ/л, $p=0,011$).

Методом ДНК-микроррей в линии клеток Daudi выявлено повышение экспрессии функциональной группы генов циклин-зависимых киназ (CDC 2, 4, 5, 9, 10) и регуляторов их активности (циклинов B1 и D3).

Положения, выносимые на защиту

1. Соматическая рекомбинация генов тяжёлых цепей иммуноглобулинов в популяциях МПК здоровых лиц и пациентов с ХВГС характеризуется поликлональным типом генных реаранжировок. Поликлональные реаранжировки генов тяжёлых цепей иммуноглобулинов представлены двумя вариантами соматической рекомбинации: первый вариант характеризуется преобладанием фрагментов, равных по длине полному рекомбинационному продукту FR1-JH (300–390 н.п.); второй вариант характеризуется равномерным соотношением фрагментов в диапазоне от 200 н.п. до 390 н.п. Первый вариант выявляется преимущественно в популяциях МПК здоровых лиц (77%

образцов), второй вариант характерен для пациентов с ХВГС (70% образцов, $p=0,018$). Для реаранжировок генов тяжёлых цепей иммуноглобулинов пациентов с ХВГС не характерна (10% образцов, $p=0,006$) незавершённая соматическая рекомбинация, связанная с фрагментом ДНК длиной 1300 н.п., выявляемым преимущественно у здоровых лиц (68% образцов).

2. Средняя активность фермента ЦДА сыворотки крови здоровых лиц характеризуется низким абсолютным значением ($1,7 \pm 0,14$ МЕ/л), нормальным распределением признака и высокой индивидуальной вариативностью.

3. Активность ЦДА сыворотки крови у пациентов с вирусными инфекциями и здоровых лиц имеет отличия: активность ЦДА снижена относительно здоровых лиц при ВГС-инфекции ($1,1 \pm 0,06$ МЕ/л, $p < 0,001$) и ВГЧ-6-инфекции ($0,6 \pm 0,19$ МЕ/л, $p=0,001$). Средняя активность ЦДА пациентов с ВИЧ-инфекцией снижена относительно здоровых лиц ($M \pm m$: $0,8 \pm 0,33$ МЕ/л; Me , P_{25} – P_{75} : $0,2$ МЕ/л, $0,1$ – $1,0$ МЕ/л). Специфическим признаком активности ЦДА у пациентов с ВИЧ-инфекцией является более частое выявление образцов с отсутствием активности ЦДА в сыворотке крови (14% для ВИЧ; 2% – у здоровых лиц, $p=0,029$; не выявляются у пациентов с ХВГС, $p=0,033$). Активность АДА в сыворотке крови достоверно ниже у пациентов с ХВГС ($6,8 \pm 0,85$ МЕ/л, $p=0,012$) и с ВГЧ-6-инфекцией ($5,8 \pm 1,17$ МЕ/л; $p=0,017$), чем у здоровых лиц ($10,2 \pm 0,97$ МЕ/л). Для пациентов с средним (10 000 – 100 000 копий/мл) и высоким (более 100 000 копий/мл) содержанием РНК ВИЧ активность АДА сыворотки крови также выше ($17,39 \pm 2,42$ МЕ/л) и достоверно отличается от пациентов с низким содержанием (менее 10 000 копий/мл) РНК ВИЧ ($11,4 \pm 1,06$ МЕ/л, $p=0,011$).

4. Острый инфекционный мононуклеоз сопровождается поликлональным типом соматической рекомбинации генов тяжёлых цепей иммуноглобулинов в популяциях МПК. Для 80% ($p=0,005$) пациентов с острым инфекционным мононуклеозом характерно равномерное соотношение фрагментов генных реаранжировок в диапазоне от 200 н.п. до 390 н.п. В-лимфоциты линии Daudi, имеющие латентное носительство вируса Эпштейна–Барр, характеризуются специфической экспрессией генов циклинов В1 и D3, не выявляемой в неинфицированных МПК человека. Экспрессия генов циклин-зависимых киназ 4 и 5 (CDC 4, CDC 5) для линии Daudi в 3 раза выше, чем в неинфицированных МПК.

Личный вклад соискателя учёной степени

Тема диссертационного исследования, цель, задачи и методологические подходы сформулированы соискателем совместно с научным руководителем. Соискатель самостоятельно выполнил ПЦР-исследование и установил закономерности соматической рекомбинации генов тяжёлых цепей иммуноглобулинов у здоровых лиц и пациентов с вирусными инфекциями, что

отражено в публикациях, написанных без соавторов [2] и в соавторстве с научным руководителем [13]. Оцифровка и интерпретация результатов ПЦР-исследования отражены в публикациях [1, 9, 16], вклад соискателя – 90%. Закономерности активности ЦДА и АДА в сыворотке и плазме крови линейных мышечных, здоровых лиц и пациентов с вирусными инфекциями отражены в публикациях [1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 14, 15, 17, 18, 21], вклад соискателя – 85%. Все исследования активности иммуноферментов выполнены соискателем самостоятельно. На основании проведенного исследования активности фермента ЦДА разработана инструкция по применению, утвержденная Министерством здравоохранения Республики Беларусь [22], вклад соискателя – 85%. ДНК-микрочип-исследование выполнено соискателем самостоятельно. Анализ результатов проведен совместно с научным руководителем. Закономерности экспрессии генов иммунной системы В-лимфоцитами линии Daudi отражены в публикациях [10, 12, 19], вклад соискателя – 90%.

Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов

Результаты исследования доложены и обсуждены на юбилейной научно-практической конференции, посвященной 90-летию основания кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии БГМУ (Минск, 2013); научно-практических конференциях «Современные проблемы инфекционной патологии человека» (Минск, 2013, 2014); Республиканской научно-практической конференции, посвященной 50-летию медико-профилактического факультета БГМУ (Минск, 2015); Первой Балтийской конференции «Иммунологическое моделирование – теория и практика» (Рига, Латвийская Республика, 2015); Республиканском семинаре «Современные методы исследования в клинической и экспериментальной иммунологии и аллергологии» (Минск, 2015); юбилейной научной конференции, посвященной 125-летию со дня рождения выдающегося белорусского микробиолога Б. Я. Эльберта (Минск, 2015); юбилейной конференции, посвященной 90-летию санитарной службы Республики Беларусь (Минск, 2016); научных сессиях учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет» (2013, 2014, 2015, 2017); ежегодном съезде Американской Академии аллергии, астмы и иммунологии (Хьюстон, США, 2015); ежегодных конгрессах Европейской Академии аллергии и клинической иммунологии (Барселона, Испания, 2015; Вена, Австрия, 2016); ежегодных сессиях Американского колледжа астмы, аллергии и иммунологии (Атланта, США, 2014; Сан-Антонио, США, 2015, 2016). Результаты исследования внедрены в образовательный процесс кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет», что отражено в двух актах внедрения.

Опубликование результатов диссертации

По теме диссертации опубликовано 22 печатные работы: журнальных статей – 4 (2 статьи написаны единолично), соответствующих пункту 18 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь», объемом 1,9 авторских листа; статей в сборниках научных трудов и материалов конференций – 9, объемом 3,0 авторских листа; тезисов докладов – 8 (за рубежом – 8). Министерством здравоохранения Республики Беларусь утверждена 1 инструкция по применению: рег. № 020-0516.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 122 страницах текста. Работа проиллюстрирована 26 рисунками, 18 таблицами и содержит приложение (5 страниц). Диссертация состоит из оглавления, перечня условных обозначений, введения, общей характеристики работы, главы аналитического обзора литературы, главы, содержащей материалы и методы исследования, 4 глав, посвященных результатам собственных исследований и их обсуждению, заключения, библиографического списка, включающего 205 источников (на русском языке – 20, на иностранном – 185), списка публикаций соискателя, приложения.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы исследования

В соответствии с целью и задачами исследования на начальном этапе была определена активность иммуноферментов ЦДА и АДА и охарактеризовано состояние соматической рекомбинации (ПЦР-исследование) в группе из 47 здоровых лиц (средний возраст $26,3 \pm 1,10$ лет) без тяжёлых форм хронической патологии и острых заболеваний. Далее проводилось сравнительное исследование данных показателей в группах пациентов с вирусными инфекциями (таблица 1). Материал от пациентов с ВИЧ-инфекцией и ХВГС получен в учреждении здравоохранения «Городская клиническая инфекционная больница» (Минск, Республика Беларусь). Для уточнения уровня активности ЦДА у пациентов с ВГС дополнительно к исследованным группам (таблица 1) проводилось измерение активности ЦДА в 153 образцах сыворотки крови от пациентов, прошедших исследование на вирусную нагрузку. В 97 образцах вирусная нагрузка была обнаружена, в 56 – отсутствовала. Материал от пациентов с острым ИМ получен в лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (Минск, Республика Беларусь). Сыворотки от пациентов с ВГЧ-6-инфекцией были предоставлены из коллекции образцов от пациентов с герпетическими инфекциями в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии.

Таблица 1. – Характеристика групп обследованных лиц и объёма исследований

Группы	Всего, n	Мужчины, n	Женщины, n	Тип материала	Средний возраст, M±SD (CI 95%)	Активность ЦДА, n	Активность АДА, n	ПЦР, n
Здоровые лица	47	26	21	МПК и сыворотка	26,3±6,42 (24,4–28,2)	47	34	26
ХВГС	29	16	13	МПК и сыворотка	44,4±17,41 (36,5–52,3)	29	29	10
ВИЧ-инфекция	77	49	28	Сыворотка	20-45	77	77	–
Острый ИМ	26	13	13	МПК и парные сыворотки	22,0±4,49 (20,3–23,7)	26 × 2	26 × 2	10
ВГЧ-6-инфекция	13	–	–	Сыворотка	18–30	13	13	–
Итого	192	104	75	–	–	218	205	46

Экспериментальные исследования по измерению активности ЦДА проводили на линейных мышах C57BL/6 (возраст – 7–10 месяцев, весом свыше 30 г), полученных из фонда вивария БГМУ, в соответствии с международными и принятыми в Республике Беларусь принципами и требованиями биоэтики [AVMA, 2013; Полоз А. И., Финогенов А. Ю., 2008]. Активность ЦДА исследовалась в образцах плазмы крови (n=24) и лизатах культур спленоцитов (n=10). После центрифугирования культур спленоцитов в градиенте урографин/фикол плотностью 1,083 г/л выполнялась низкотемпературная дезинтеграция (–75 °С) 50 млн клеток в 1 мл фосфатно-солевого буфера.

Активность ЦДА и АДА измеряли в индофенольной колориметрической реакции по методике [Giusti G., Galanti B., 1984 с дополнениями Янович О. О., Титов Л. П., 2012] со следующим соотношением реакционных компонентов: 200 мкл субстратного раствора: 20 мкл исследуемой сыворотки: 600 мкл фенольно-нитропруссидного раствора (Sigma-Aldrich, США): 600 мкл основного раствора гипохлорита натрия (Sigma-Aldrich, США). Для приготовления субстратных растворов использованы цитидин (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 10,5 мМоль/л, аденозин (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 21 мМоль/л. Для сравнения был использован раствор атипичного нуклеозида гемцитабина (Хетеро Лабс, Индия) в той же концентрации, что и цитидин. Цитидин с исследуемой сывороткой инкубировался в течение 22 часов, аденозин – одного часа.

Анализ соматических рекомбинаций генов тяжёлых цепей иммуноглобулинов проводили с праймерами набора «ISH Somatic Hypermutation Assay» (In Vivo scribe Technologies, USA), рекомендуемого производителем как стандартизированный метод для оценки клонального статуса. Перед выделением ДНК в образцах МПК здоровых лиц на проточном

цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США) оценивались параметры прямого и бокового светорассеяния и содержание поверхностных молекул CD19. Экстракцию ДНК из клеточного материала проводили набором «Нуклеосорб-В» (Праймтех, Республика Беларусь). Спектр ПЦР-продуктов исследовали с помощью агарозного гель-электрофореза. Электрофореграммы анализировали пакетом программ GelAnalyzer (Lazarsoftware, США).

Используя диагностические ДНК-чипы «Human Discover Chips™» (ArrayIT, США) была определена экспрессия 390 генов-регуляторов основных метаболических путей клеточной физиологии, функционирования иммунной системы и реализации генома в культурах клеток МПК от 12 здоровых лиц (исследовано среднее (Mean) значение) и культуре клеток Daudi (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Республика Беларусь). Для выявления специфической экспрессии генов, характерных для культуры Daudi, сравнение проводилось также с профилями экспрессии культур клеток ТНР-1-острый моноцитарный лейкоз и МТ-2-Т-лимфобластный лейкоз (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Республика Беларусь). РНК была получена из 40 млн клеток с помощью «Tri-реагента» (Applied biosystems, США), синтез кДНК выполнен с помощью набора «SuperScript Direct plus cDNA Labeling System» (Invitrogen, США). Сканирование ДНК-чипов проводили конфокальным сканером ArrayIt InnoScan 700 и пакета программ Marix 4.5 (Carbone, Франция). Для обработки результатов ДНК-микрочипов исследования использован пакет программ Expander 6v (ICSI, Израиль).

Статистическая обработка результатов исследования выполнена с использованием программы STATISTICA 6.0 (StatSoft, США). При исследовании активности ЦДА и АДА использованы методы описательной статистики. Средние данные (МЕ/л) представлены в виде ($M \pm m$). Для оценки нормальности распределения использован критерий Колмогорова–Смирнова. Статистическая оценка значимости отличий средних величин исследовалась с использованием t-критерия Стьюдента и его уровня значимости $p < 0,05$. Для выборок с распределением, отличным от нормального, использован U-критерий Манна–Уитни. Однофакторный корреляционный анализ проводился с расчётом коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r_s) и его уровня значимости $p < 0,05$. Для сравнения двух независимых групп по качественному признаку использованы критерий χ^2 Пирсона с поправкой Йейтса и его уровень статистической значимости $p < 0,05$ и точный критерий Фишера (использован при показе результатов) и его уровень статистической значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

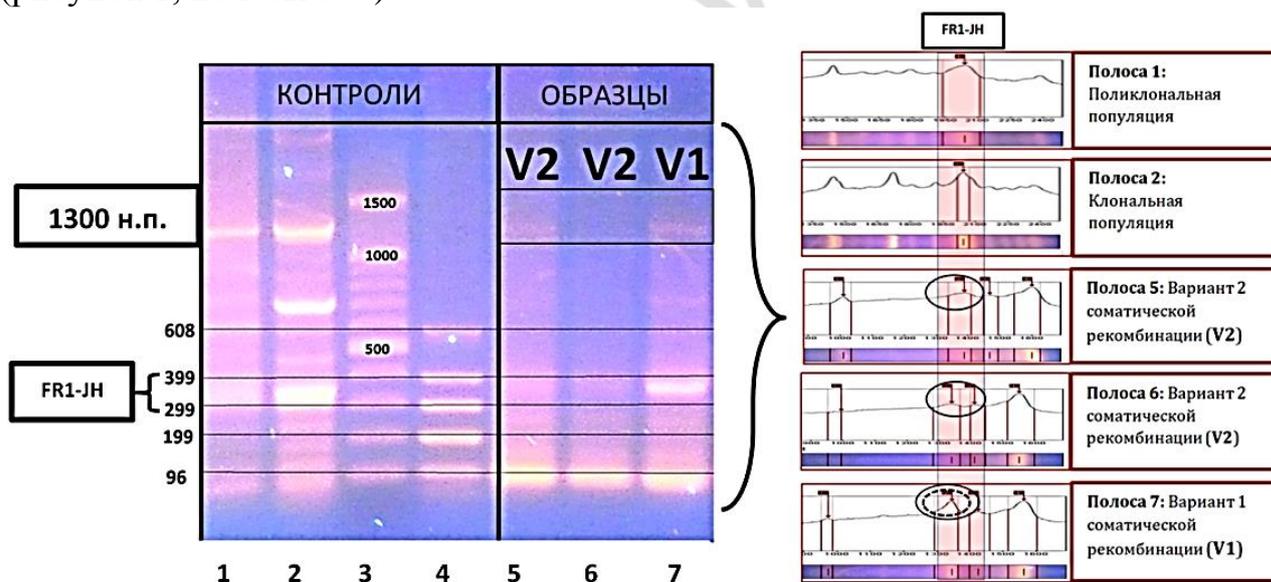
Соматическая рекомбинация генов тяжёлых цепей иммуноглобулинов

В результате исследования соматической рекомбинации генов тяжёлых цепей иммуноглобулинов (рисунок 1) в популяциях МПК здоровых лиц ($n=26$) были выявлены следующие общие закономерности:

1) все образцы МПК (100%) содержали продукты специфических V(D)J-реаранжировок в диапазоне от 300 н.п. до 390 н.п., что соответствует поликлональному типу соматической рекомбинации (рисунок 1, полосы 5–7);

2) для 100% популяций МПК было характерно присутствие ПЦР-продуктов в диапазоне 200 н.п. до 390 н.п., что соответствует стандартной длине FR2-JH фрагмента генных реаранжировок;

3) для всех исследованных популяций МПК здоровых лиц (100%) было характерно присутствие ампликонов в диапазоне 100 н.п. до 150 н.п., что соответствует стандартной длине FR3-JH фрагмента генных реаранжировок (рисунок 1, полосы 5–7).



Полоса 1 – поликлональный контроль; **Полоса 2** – клональный контроль; **Полосы 3, 4** – маркёры молекулярного веса; **Полосы 5-6** – второй (V2) вариант соматической рекомбинации (на графиках овалом показано отсутствие пика интенсивности содержания ПЦР-продуктов); **Полоса 7** – первый (V1) вариант соматической рекомбинации (на графике двойным овалом выделен пик интенсивности содержания ПЦР-продуктов)

Рисунок 1. – Соматическая рекомбинация генов тяжёлых цепей иммуноглобулинов для МПК здоровых лиц

Процентное содержание В-лимфоцитов для исследованных здоровых лиц соответствовало физиологическим значениям ($10,8 \pm 0,84\%$) и не отличалось значительной вариабельностью (CI 95% 9,0–12,6).

После оцифровки электрофореграмм в программе GelAnalyzer в качестве критерия для выделения вариантов соматической рекомбинации было введено

числовое соотношение абсолютных уровней яркости флуоресценции (Raw volume) итоговых продуктов генных реаранжировок FR1-ЖН (от 300 н.п. до 390 н.п.) и продукта, соответствующего по длине FR2-ЖН-фрагменту (от 200 н.п. до 390 н.п.). При яркости FR1-ЖН фрагментов в 1,5 и более раз интенсивнее, чем соответствующих FR2-ЖН-фрагментам, образец относили к первому варианту соматической рекомбинации (рисунок 1, полоса 7). При разнице в яркости, меньшей 1,5, определяли как второй вариант (рисунок 1, полосы 5–6). Первый вариант чаще встречался у здоровых лиц (77% образцов), второй – у пациентов с вирусными инфекциями: с ХВГС (70% образцов, $p=0,018$) и острым ИМ (80% образцов, $p=0,005$) (таблица 2).

Таблица 2. – Различия в соматической рекомбинации генов тяжёлых цепей иммуноглобулинов у здоровых лиц, пациентов с острым ИМ и ХВГС

Исследованные группы	n образцов	Вариант рекомбинации		Фрагмент 1300 н.п.	
		1-й	2-й	присутствует	отсутствует
Здоровые лица	22	17	5	15	7
Острый ИМ	10	2	8*	5	5
ХВГС	10	3	7*	1**	9

Примечание – * встречается достоверно чаще, чем у здоровых лиц; ** встречается достоверно реже, чем у здоровых лиц.

Особенностью пациентов с ХВГС являлось более частое, чем у здоровых лиц и пациентов с острым ИМ, отсутствие фрагмента длиной 1300 н.п., соответствующего неоконченной соматической рекомбинации. Фрагмент длиной 1300 н.п. был выявлен только в 1 образце (10%) от пациентов с ХВГС ($p=0,006$) (таблица 2). У здоровых лиц данный фрагмент, наоборот, встречался чаще (68%). 7 из 10 образцов (70%) от пациентов с ХВГС характеризовались сочетанием 2 варианта соматической рекомбинации и отсутствием фрагмента 1300 н.п., связанного с незавершённой соматической рекомбинацией. Для здоровых лиц подобное сочетание было только в 3 из 22 оцифрованных образцов (13%).

Характеристика активности иммуноферментов ЦДА и АДА

Активность ЦДА у линейных мышей. Методика измерения активности ЦДА оптимизировалась в исследованиях на линейных мышах С57ВL/6. Было выявлено, что ферментативная активность обнаруживается в плазме при долгосрочной инкубации (22 часа). Полученные показатели ферментативной активности у линейных мышей С57ВL/6 ($n=24$) характеризовались низким абсолютным значением: $2,6 \pm 0,48$ МЕ/л (Me, $P_{25}-P_{75}$; 1,7 МЕ/л, 1,4–2,4 МЕ/л). Активность ЦДА выявлялась в лизатах культур спленоцитов ($n=10$). При исследовании лизатов 50 млн спленоцитов на 1 мл фосфатно-солевого буфера была отмечена низкая ферментативная активность $1,7 \pm 0,33$ МЕ (Me, $P_{25}-P_{75}$; 1,7 МЕ, 1,0–2,1 МЕ).

Активность ЦДА сыворотки крови здоровых лиц. Средняя активность ЦДА у здоровых лиц характеризовалась низким значением ($1,7 \pm 0,14$ МЕ/л) и высокой вариативностью по основным статистическим показателям (таблица 3) при сохранении нормального распределения признака (критерий Колмогорова–Смирнова, $p > 0,20$).

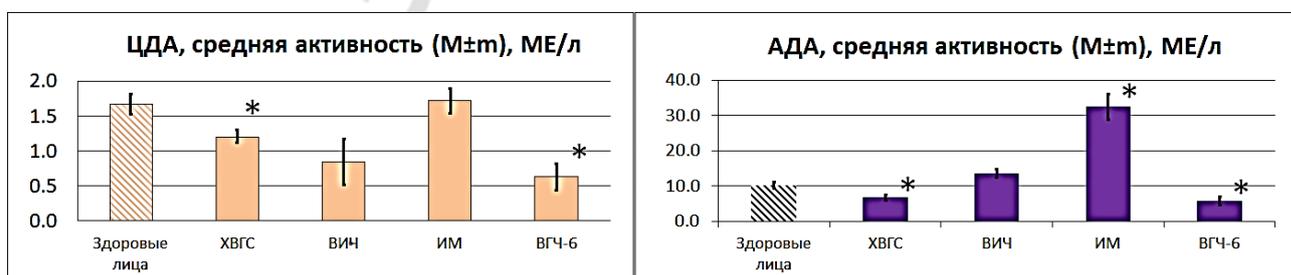
Таблица 3. – Показатели активности ЦДА и АДА у здоровых лиц

Выборка	n	Средняя активность (M±m), МЕ/л	Медиана (Me), МЕ/л	Стандартное отклонение, доверительный интервал (SD; CI 95%), МЕ/л	Min-значение, МЕ/л	Max-значение, МЕ/л
ЦДА						
Здоровые лица	47	$1,7 \pm 0,14$	1,7	0,99; 1,4–2,0	0,0	4,9
Мужчины	26	$2,0 \pm 0,22^*$	1,9	1,15; 1,5–2,4	0,5	4,9
Женщины	21	$1,3 \pm 0,12^*$	1,4	0,57; 1,1–1,6	0,0	2,5
АДА						
Здоровые лица	36	$10,2 \pm 0,97$	7,9	5,85; 8,2–12,2	0,5	26,9
Мужчины	17	$10,4 \pm 1,35$	7,8	5,57; 7,5–13,3	0,5	20,3
Женщины	19	$10,0 \pm 1,43$	7,9	6,23; 7,0–13,0	3,2	26,9

Примечание – * статистически значимый уровень различий со всей группой здоровых лиц $p < 0,05$.

Средняя активность ЦДА у мужчин составила $2,0 \pm 0,22$ МЕ/л и достоверно отличалась ($p = 0,024$) от активности у женщин – $1,3 \pm 0,12$ МЕ/л (таблица 3). Средняя активность АДА ($10,2 \pm 0,97$ МЕ/л), напротив, не характеризовалась статистически значимыми различиями ($p = 0,8175$) по половому признаку ($10,4 \pm 1,35$ МЕ/л – для мужчин, $10,0 \pm 1,43$ МЕ/л – для женщин).

Активность ЦДА у пациентов с вирусными инфекциями и здоровых лиц характеризуется существенными отличиями (рисунок 2).



* статистически значимый уровень различий с группой здоровых лиц $p < 0,05$.

Рисунок 2. – Сравнение активностей ЦДА и АДА при вирусных инфекциях

ХВГС. Были исследованы сыворотки от 29 пациентов с диагнозом ХВГС (исследование 1) и 97 – с вирусной нагрузкой (исследование 2). Снижение ферментативной активности ЦДА достоверно выявляется как у пациентов с ХВГС ($1,2 \pm 0,09$ МЕ/л, $p = 0,021$) относительно здоровых лиц ($1,7 \pm 0,14$ МЕ/л)

(исследование 1), так и в сыворотках с вирусной нагрузкой ($1,0 \pm 0,06$ МЕ/л, $p=0,015$) относительно сывороток без вирусной нагрузки ($1,7 \pm 0,30$ МЕ/л) (исследование 2). Средняя активность ЦДА для всех ($n=126$) пациентов с ВГС-инфекцией ($1,1 \pm 0,06$ МЕ/л) также имеет достоверные различия с группой здоровых лиц ($p < 0,001$). Контроль специфичности реакции проводился с использованием субстратного раствора цитидиноподобного нуклеозида гемцитабина. Для 80 образцов сыворотки, произвольно отобранных среди обследованных на вирусную нагрузку ВГС, показатели оптической плотности в колориметрической реакции для цитидина и гемцитабина выявили крайне высокую корреляцию ($r_s=0,93$, $p < 0,05$).

Сывороточная активность АДА достоверно ниже у пациентов с ХВГС ($6,8 \pm 0,85$ МЕ/л, $p=0,012$), чем у здоровых лиц.

ВИЧ-инфекция. В сыворотках крови 77 пациентов с ВИЧ-инфекцией выявлена ещё более низкая, чем у пациентов с ВГС, активность ЦДА ($0,8 \pm 0,33$ МЕ/л, $p < 0,05$, для критерия Манна–Уитни). Плотность распределения показателей ферментативной активности ЦДА у пациентов с ВИЧ-инфекцией характеризовалась преобладанием образцов с меньшим, чем среднее, значением активности: 87% исследованных образцов находятся в диапазоне от M до -2σ (критерий Колмогорова–Смирнова, $p < 0,01$). Значение медианы и интерквартильного размаха для данной группы составили (Me , P_{25} – P_{75} ; $0,2$ МЕ/л, $0,1$ – $1,0$ МЕ/л). Для пациентов с ВИЧ-инфекцией достоверно чаще (14%) отмечалось выявление образцов с отсутствием активности ЦДА, чем у здоровых лиц (2%, $p=0,029$) и пациентов с ХВГС (не характерно, $p=0,033$).

При исследовании активности АДА во всей выборке пациентов с ВИЧ-инфекцией выявлено среднее значение ($13,6 \pm 1,15$ МЕ/л), не отличающееся значимыми различиями с группой здоровых лиц ($p=0,064$). При этом активность АДА имеет умеренную связь ($r_s=0,37$; $p=0,001$) с уровнем вирусной нагрузки. Для пациентов с средней ($10\ 000$ – $100\ 000$ копий/мл) и высокой (более $100\ 000$ копий/мл) вирусной нагрузкой активность АДА сыворотки крови также выше ($17,39 \pm 2,42$ МЕ/л) и достоверно отличается от пациентов с низкой вирусной нагрузкой (менее $10\ 000$ копий/мл) ($11,4 \pm 1,06$ МЕ/л, $p=0,011$) и здоровых лиц ($10,2 \pm 0,97$ МЕ/л, $p=0,004$). Среди образцов с высокой вирусной нагрузкой активность АДА свыше 25 МЕ/л встречалась достоверно чаще, чем среди образцов с низкой вирусной нагрузкой ($p=0,018$) и здоровых лиц ($p=0,003$).

Острый ИМ. При исследовании активности ЦДА 26 парных сывороток, собранных во время заболевания и в период реконвалесценции, установлено отсутствие значимых отличий активности у здоровых лиц как во время заболевания ($1,7 \pm 0,18$ МЕ/л, $p=0,851$), так и в период реконвалесценции ($1,9 \pm 0,12$ МЕ/л, $p=0,371$). Напротив, активность АДА при остром ИМ достоверно повышена ($32,4 \pm 3,59$ МЕ/л, $p < 0,001$). Впоследствии, при повторном

исследовании в период реконвалесценции, выявленная активность АДА характеризовалась низким значением ($4,3 \pm 0,72$ МЕ/л). Данный показатель в 2 раза ниже ($p < 0,001$), чем у здоровых лиц ($10,2 \pm 0,97$ МЕ/л).

ВГЧ-6-инфекция. Исследование 13 сывороток крови пациентов с подтверждённой ВГЧ-6-инфекцией выявило наиболее низкое из всех исследованных групп значение активности ЦДА ($0,6 \pm 0,19$ МЕ/л, $p = 0,001$). Активность АДА также была достоверно ниже у пациентов с ВГЧ-6-инфекцией ($5,8 \pm 1,17$ МЕ/л, $p = 0,017$), чем у здоровых лиц.

Экспрессия генов иммунной системы В-лимфоцитов линии Daudi

Daudi – В-лимфоцитоподобная культура клеток человека, происходящих из лимфомы Беркитта. При сравнении транскриптома культуры Daudi с транскриптомом МПК (рисунок 3) выявлены следующие особенности:

1) для культуры Daudi характерна повышенная экспрессия группы генов, связанных с активностью циклин-зависимых киназ ($n=8$: *CDK9*, *CDC37*, *CDC2-like*, *CDC2*, *CDC4*, *CDC5*, *CDC12A*, *CDC12D*) – регуляторов клеточного цикла. Уровень различий в экспрессии (fold change) генов циклин-зависимых киназ 4 и 5 (*CDC 4*, *CDC 5*) в данной культуре в 3 раза выше, чем в неинфицированных МПК. Линия Daudi характеризуется специфической экспрессией генов циклинов В1 и D3, не выявляемой в МПК.

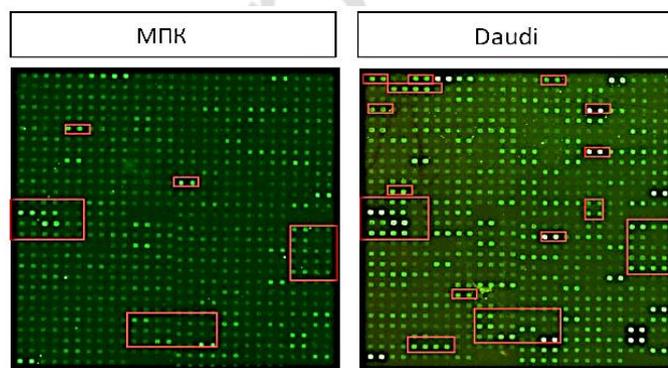


Рисунок 3. – Отличия в экспрессии генов МПК и Daudi при сканировании ДНК-чипов

2) культура Daudi характеризовалась экспрессией 18 генов, не выявлявшихся в транскриптоме как МПК, так и ТНР-1 и МТ-2 – *CCNB1* (ген циклина В1), *MYB* (ген миелобластного активатора транскрипции), *MYC* (ген проонкогенного белка-регулятора транскрипции), *FUBP1* (гена-стимулятор экспрессии генов MYC), *CCND3* (ген циклина D3), *PRKDC* (ген каталитического домена протеин-киназы), *STAT5A* (ген сигнального активатора транскрипции), *MAN2B1* (ген фермента маннозидазы), *VAMP* (ген структурного белка везикул), *EGR1* (ген транскрипционного фактора), *IL12RB2* (ген рецептора интерлейкина 2), *ITGAE* (ген рецептора к катгерину), *E2F1* (ген транскрипционного фактора), *SLC22A2* (ген универсального транспортёра гормонов и нейромедиаторов), *CXCR2* (ген рецептора к интерлейкину 8),

MTHFR (ген компонента дыхательной цепи), *SOD1* (ген антиоксидантного фактора), *PLK* (ген киназы, регулирующей формирование centrosом).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Соматическая рекомбинация генов тяжёлых цепей иммуноглобулинов в популяциях МПК здоровых лиц характеризуется поликлональным типом генных реаранжировок. Все образцы МПК содержали в геноме продукты специфических V(D)J-реаранжировок. Поликлональные реаранжировки генов тяжёлых цепей иммуноглобулинов здоровых лиц и пациентов с ХВГС представлены двумя вариантами соматической рекомбинации: первый вариант характеризуется преобладанием фрагментов, равных по длине полному рекомбинационному продукту FR1-JH (300–390 н.п.); второй вариант характеризуется равномерным соотношением фрагментов генных реаранжировок в диапазоне от 200 н.п. до 390 н.п. Первый вариант выявляется преимущественно в популяциях МПК здоровых лиц (77% образцов), второй вариант характерен для пациентов с ХВГС (70% образцов, $p=0,018$). Для реаранжировок генов тяжёлых цепей иммуноглобулинов пациентов с ХВГС не характерна (10% образцов, $p=0,006$) незавершённая соматическая рекомбинация, связанная с фрагментом длиной 1300 н.п., выявляемым преимущественно у здоровых лиц (68% образцов) [1, 2, 9, 13, 16].

2. Активность фермента ЦДА сыворотки крови здоровых лиц характеризуется низким абсолютным значением ($1,7\pm 0,14$ МЕ/л), нормальным распределением признака и высокой индивидуальной вариативностью. Активность фермента ЦДА является переменным иммунологическим показателем у здоровых лиц, связанным с иммуногенезом: активность ЦДА у здоровых лиц характеризуется более высоким диапазоном индивидуальными колебаниями, чем процентное содержание CD19+ В-лимфоцитов и состояние соматической рекомбинации генов тяжёлых цепей иммуноглобулинов. Активность ЦДА здоровых лиц зависит от пола: активность ЦДА у мужчин составляет $2,0\pm 0,22$ МЕ/л и достоверно отличается ($p=0,024$) от активности у женщин – $1,3\pm 0,12$ МЕ/л. Активность АДА в сыворотке крови здоровых лиц не показала статистически значимых различий ($p=0,816$) по половому признаку ($10,4\pm 1,35$ МЕ/л – для мужчин, $10,0\pm 1,43$ МЕ/л – для женщин) [1, 3, 5, 6, 7, 8, 14, 15, 17, 21, 22].

3. ВГС-инфекция сопровождается достоверным снижением активности двух иммуноферментов (как ЦДА, так и АДА). Снижение активности ЦДА сыворотки крови выявляется как у пациентов с ХВГС ($1,2\pm 0,09$ МЕ/л, $p=0,020$) относительно здоровых лиц ($1,7\pm 0,14$ МЕ/л), так и при сплошном исследовании

у лиц с вирусной нагрузкой ($1,0 \pm 0,06$ МЕ/л, $p=0,015$) относительно лиц без вирусной нагрузки ($1,7 \pm 0,30$ МЕ/л). Суммарная средняя активность ЦДА для всех ($n=126$) пациентов с ВГС-инфекцией ($1,1 \pm 0,06$ МЕ/л) имеет достоверные различия с группой здоровых лиц ($p < 0,001$).

Активность АДА в сыворотке крови также достоверно ниже у пациентов с ХВГС ($6,8 \pm 0,85$ МЕ/л, $p=0,012$), чем у здоровых лиц ($10,2 \pm 0,97$ МЕ/л) [1, 3, 4, 7, 11, 18, 21].

4. При инфекциях, вызванных ВГЧ-6, наблюдается наиболее низкое из всех исследованных групп значение активности как ЦДА сыворотки крови ($0,6 \pm 0,19$ МЕ/л, $p=0,001$) относительно здоровых лиц ($1,7 \pm 0,14$ МЕ/л), так и АДА сыворотки крови ($5,8 \pm 1,17$ МЕ/л, $p=0,017$) относительно здоровых лиц ($10,2 \pm 0,97$ МЕ/л).

Активность ЦДА пациентов с ВИЧ-инфекцией снижена относительно здоровых лиц и характеризуется распределением, отличным от нормального, с преобладанием образцов (87%) ниже среднего значения ($M \pm m$: $0,8 \pm 0,33$ МЕ/л; Me , P_{25} – P_{75} : $0,2$ МЕ/л, $0,1$ – $1,0$ МЕ/л). Характерным признаком активности ЦДА у пациентов с ВИЧ-инфекцией является более частое выявление образцов с отсутствием активности ЦДА в сыворотке крови (14% для ВИЧ; 2% – у здоровых лиц, $p=0,029$; не выявляются у пациентов с ХВГС, $p=0,033$). Активность АДА сыворотки крови выше ($17,39 \pm 2,42$ МЕ/л) у ВИЧ-инфицированных пациентов с высокой (более 100 000 копий/мл) и средней (10 000–100 000 копий/мл) вирусной нагрузкой, чем у пациентов с низкой вирусной нагрузкой (менее 10 000 копий/мл) ($11,4 \pm 1,06$ МЕ/л).

Острый инфекционный мононуклеоз не сопровождается значимыми отличиями от здоровых лиц в сывороточной активности ЦДА ни во время заболевания ($1,7 \pm 0,18$ МЕ/л, $p=0,851$), ни в период реконвалесценции ($1,9 \pm 0,12$ МЕ/л, $p=0,371$). Напротив, активность АДА во время острого инфекционного мононуклеоза достоверно повышается ($32,4 \pm 3,59$ МЕ/л, $p < 0,001$). При этом среднее значение активности АДА достоверно ниже в период реконвалесценции ($4,3 \pm 0,72$ МЕ/л, $p < 0,001$) чем у здоровых лиц ($10,2 \pm 0,97$ МЕ/л) [1, 7, 11, 17, 18, 20, 21, 22].

5. Острый инфекционный мононуклеоз сопровождается поликлональным типом соматической рекомбинации генов тяжёлых цепей иммуноглобулинов в популяциях МПК. Для 80% ($p=0,005$) пациентов с острым инфекционным мононуклеозом характерен второй выделенный вариант соматической рекомбинации, характеризовавшийся равномерным соотношением фрагментов генных реаранжировок в диапазоне от 200 н.п. до 390 н.п.

Культура клеток Daudi характеризовалась экспрессией 18 генов, не экспрессируемых в культурах неинфицированных МПК: CCNB1, MYB, MYC, FUBP1, CCND3, PRKDC, STAT5A, MAN2B1, VAMP, EGR1, IL12RB2,

ITGAE, E2F1, SLC22A2, CXCR2, MTHFR, SOD1, PLK. Характерной чертой экспрессии генов иммунной системы В-лимфоцитов линии Daudi, в сравнении с культурами МПК, является повышенная экспрессия группы генов, связанных с активностью циклин-зависимых киназ: В-лимфоциты линии Daudi характеризуются специфической экспрессией генов циклинов B1 и D3, не выявляемой в неинфицированных МПК. Экспрессия генов циклин-зависимых киназ 4 и 5 (CDC 4, CDC 5) линии Daudi в 3 раза выше, чем в неинфицированных МПК [1, 2, 10, 12, 19].

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. Метод исследования состояния соматической рекомбинации генов тяжёлых цепей иммуноглобулинов в популяциях МПК с оцифровкой спектра ПЦР-продуктов [2, 9] внедрён в учебный процесс кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии «Белорусского государственного медицинского университета». Данное исследование рекомендуется для учреждений здравоохранения, проводящих диагностику причин иммунодефицитных состояний, в дополнение к стандартным лабораторным методам оценки иммунного статуса для выявления нарушений генетического контроля иммунного ответа, характерных для наличия ВГС-инфекции [1, 2, 13].

2. Исследование активности иммуноферментов ЦДА и АДА сыворотки крови рекомендуется использовать в дополнение к стандартным лабораторным методам оценки иммунного статуса в учреждениях здравоохранения, проводящих диагностику иммунодефицитных состояний и оказывающих помощь пациентам с ВИЧ-инфекцией. Выявление отсутствия активности ЦДА в сыворотке крови с помощью методики, изложенной в инструкции по применению Министерства здравоохранения Республики Беларусь «Метод лабораторной диагностики ВИЧ-ассоциированных иммунодефицитных состояний», рег. № 020-0516 [22], рекомендуется использовать как фактор риска наличия ВИЧ-инфекции. Исследование активности АДА у пациентов с ВИЧ-инфекцией рекомендуется использовать в качестве фактора риска наличия высокой и средней вирусной нагрузки.

3. В работе предложены подходы по пробоподготовке, обработке и интерпретации результатов ДНК-микроэрей исследования. Выявленные закономерности латенции ВЭБ, связанные с активностью генов, циклин-зависимых киназ и белков циклинов, рекомендуются для создания диагностической тест-системы на основе экспрессионного ПЦР.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ АВТОРА

Статьи в рецензируемых научных журналах

1. Цитидиндезаминаза и аденозиндезаминаза – ферменты, контролирующие интенсивность и специфичность иммунного ответа: стандартизация активности в норме и диагностическая значимость при заболеваниях / К. И. Павлов, Л. П. Титов, А. Е. Гончаров, О. А. Янович, С. В. Жаворонок // Медицинский журнал. – 2014. – № 4. – С. 98–103.

2. Павлов, К. И. Диагностическая значимость исследования реаранжировок генов тяжёлых цепей иммуноглобулинов / К. И. Павлов // Лечебное дело. – 2015. – № 1. – С. 46–51.

3. Павлов, К. И. Исследование активности цитидиндезаминазы с использованием гемцитабина в качестве субстрата / К. И. Павлов // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2015. – № 2. – С. 70–73.

4. Активность цитидиндезаминазы у беременных с хроническим вирусным гепатитом С / Т. В. Зновец, К. И. Павлов, С. В. Жаворонок, Л. П. Титов // Медицинский журнал. – 2015. – № 3. – С. 71–74.

Статьи в научных сборниках и материалах конференций

5. Павлов, К. И. Активность ферментов-индукторов соматических гипермутаций в спленоцитах мышей линии СВ57/BL, амниотической и аллантаисной жидкости куриных эмбрион / К. И. Павлов, Л. П. Титов, Л. В. Бутько // Современные проблемы инфекционной патологии человека : сб. науч. тр. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь, Респ. науч.-практ. центр эпидемиологии и микробиологии ; под ред. Л. П. Титова [и др.]. – Минск : ГУ РНМБ, 2013. – Вып. 6. – С. 328–336.

6. Павлов, К. И. Исследование активности фермента цитидиндезаминазы в цитозоле спленоцитов мыши с помощью низкотемпературной дезинтеграции клеток / К. И. Павлов, А. А. Ленкова, В. А. Александрова // Новые исследования молодых учёных 2014 : сб. науч. работ молодых учёных БГМУ / под ред. А. В. Сикорского и О. К. Кулаги. – Минск : БГМУ, 2014. – С. 101–106.

7. Павлов, К. И. Иммуноферменты цитидиндезаминаза и аденозиндезаминаза: стандартизация показателей в норме и диагностическая значимость исследования активности / К. И. Павлов, Л. П. Титов // Современные проблемы инфекционной патологии человека : сб. науч. тр. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь, Респ. науч.-практ. центр эпидемиологии и микробиологии ; под ред. Л. П. Титова [и др.]. – Минск : ГУ РНМБ, 2014. – Вып. 7. – С. 200–205.

8. Павлов, К. И. Иммунофермент цитидиндезаминаза: активность в отношении атипичных субстратов / К. И. Павлов, А. Е. Болбас // Сборник

научных работ молодых учёных БГМУ / под ред. А. В. Сикорского и О. К. Кулаги. – Минск : БГМУ, 2015. – С. 110–115.

9. Анализ ПЦР-картины соматической рекомбинации генов тяжёлых цепей иммуноглобулинов / К. И. Павлов, Л. П. Титов, М. А. Котикова, Е. Ю. Сапешко // Современные проблемы инфекционной патологии человека [Электронный ресурс] : сб. науч. ст. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. Л. П. Титова. – Минск : ГУ РНМБ, 2015. – Вып. 8. – С. 225–231. – Режим доступа: http://med.by/content/ellibsci/RNPCEIM/rnpceim_2015_8.pdf. – Дата доступа : 13.09.2017.

10. Использование культур клеток моноклеарных лейкоцитов периферической крови, HELA, THP, DAUDI и MT-2 для оценки специфичности микроэррей-исследования / К. И. Павлов, Е. В. Дуж, А. Е. Гончаров, Л. П. Титов // 90 лет в авангарде микробиологической науки Беларуси : сб. науч. тр. Респ. науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвящ. 125-летию со дня рожд. Б. Я. Эльберта / под ред. Л. П. Титова. – Минск : БГМУ, 2015. – С. 80–83.

11. Выявление индивидов с высокими значениями фермента цитидиндезаминазы в сыворотке крови / К. И. Павлов, Т. В. Зновец, Л. П. Титов, Т. А. Рогачёва, Л. А. Анисько, С. В. Жаворонок // Респ. науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвящ. 50-летию медико-профилакт. факультета : сб. науч. тр. / Белорус. гос. мед. ун-т; редкол. : А. В. Сикорский [и др.]. – Минск : БГМУ, 2015. – С. 297–303.

12. Сравнительная оценка экспрессионных профилей моноклеарных лейкоцитов периферической крови и перевиваемой линии клеток Daudi / К. И. Павлов, Е. В. Дуж, Л. П. Титов, А. Е. Гончаров // Санитарно-эпидемиологическая служба Республики Беларусь : история, актуальные проблемы на современном этапе и перспективы развития : сб. науч. тр. Междунар. науч.-практ. конф. «Здоровье и окружающая среда», посвящ. 90-летию санитарно-эпидемиол. службы Республики Беларусь (Минск, 28 октября 2016 г.): в 2 т. / редкол. : Н. П. Жукова [и др.]. – Минск : БГМУ, 2016. – Т. 2. – С. 281–283.

13. Павлов, К. И. Особенности соматической рекомбинации генов тяжёлых цепей иммуноглобулинов при инфекционном моноклеозе и ХВГС-инфекции / К. И. Павлов, Л. П. Титов // Санитарно-эпидемиологическая служба Республики Беларусь : история, актуальные проблемы на современном этапе и перспективы развития : сб. науч. тр. Междунар. науч.-практ. конф. «Здоровье и окружающая среда», посвящ. 90-летию санитарно-эпидемиол. службы Республики Беларусь (Минск, 28 октября 2016 г.): в 2 т. / редкол. : Н. П. Жукова [и др.]. – Минск : БГМУ, 2016. – Т. 2. – С. 283–286.

Тезисы докладов

14. Cytidine deaminase and adenosine deaminase are highly sensitive enzymatic regulators of immune response intensity and specificity / L. Titov, K. Pavlov, A. Hancharou, O. Yanovitch, S. Javoronok, L. M. DuBuske // Annual Meeting American College of Allergy, Asthma & Immunology, Atlanta, GA, 6–10 Nov., 2014 : abstr. (published in : *Ann. Allergy Asthma Immunol.* – 2014. – Vol. 113, No. 5 (suppl.). – P. A48).

15. Individual cytidine deaminase and adenosine deaminase variations in a highly immunologically homogenous group of healthy Belarussian adults [Electronic resource] / L. P. Titov, K. I. Pavlov, A. Y. Hancharou, L. M. DuBuske // 2015 AAAAI Ann. Meet. : abstr. (published in : *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2015. – Vol. 135, N 2, suppl. – P. AB16). – Mode of access : DOI:10.1016/j.jaci.2014.12.984. – Date of access: 14.09.2017.

16. Titov, L. P. The immunoglobulin heavy chain genes somatic recombination in B-lymphocytes populations from healthy volunteers and patients with chronic infections / L. P. Titov, K. I. Pavlov, L. M. DuBuske // Abstracts from the European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress, 6–10 June 2015, Barcelona (published in : *Allergy.* – 2015. – Vol. 70, suppl. S101. – P. 436).

17. The enzymatic mechanisms of genetic information implementation during immune response to different forms of antigenic determinants / L. P. Titov, K. I. Pavlov, E. Stolarova, S. Stolarova // *Immunological Modeling: Theory and Practice : materials 1-st Baltic Conf. : thesis book*, May 13–15, Riga Stradins University, Latvia. – 2015. – P. 34–35.

18. Immune response intensity and specificity basal activity in patients with HHV-6 infection / K. Pavlov, S. Orlova, A. Shtyrov, T. Rogacheva, L. Anisko, L. Titov // *Immunological Modeling: Theory and Practice : materials 1-st Baltic Conf. : thesis book*, May 13–15, Riga Stradins University, Latvia. – 2015. – P. 84–85.

19. DNA microarray-based expression profile of neurotransmitter receptors and second messengers by peripheral blood mononuclear leucocytes / L. Titov, K. Pavlov, A. Kapitau, L.M. DuBuske // Annual Meeting American College of Allergy, Asthma & Immunology, November 5–9, 2015 San Antonio, Texas : abstr. book. – P. A59.

20. Serum adenosine deaminase activity in patients with viral infections [Electronic resource] / L. P. Titov, K. I. Pavlov, T. V. Znovets, T. A. Rogacheva, L. A. Anisko, G. M. Davidovich, L. M. DuBuske // Abstr. European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress, Vienna, Austria, 11–15 June 2016 (published in: *Allergy.* – 2016. – Vol. 71, suppl. 102. – P. 313). – Mode of access : <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/all.12974/epdf>. – Date of access : 14.09.2017.

21. Pavlov, K. Serum cytidine deaminase activity in patients with viral infections [Electronic resource] / K. Pavlov, L. Titov, L. DuBuske // Annual Scientific Meeting of the American College of Allergy, Asthma and Immunology : Oral and Poster Abstracts, San Francisco, California, 10–14 Nov. 2016 (published in: Ann. Allergy Asthma Immunol. – 2016. – Vol. 117, suppl. 5. – P. S117, P320). – Mode of access : <http://dx.doi.org/10.1016/j.anai.2016.09.334>. – Date of access : 14.09.2017.

Инструкция по применению

22. Метод лабораторной диагностики ВИЧ-ассоциированных иммунодефицитных состояний : инструкция по применению : утв. М-вом здравоохран. Респ. Беларусь 20.05.2016, рег. № 020-0516 / сост. : К. И. Павлов, Л. П. Титов, А. Е. Гончаров, О. О. Янович, Т. В. Зновец, С. В. Жаворонок. – Минск : БГМУ, РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, 2016. – 9 с.

Паўлаў Кірыл Ігаравіч**Стан малекулярна-генетычных механізмаў, кантралюючых імунагенез пры вірусных інфекцыйных захворваннях чалавека**

Ключавыя словы: імунагенез, саматычная рэкамбінацыя, цыцідзіндэзаміназа, вірус імунадэфіцыту чалавека, хранічны вірусны гепатыт С, вірус Эпштэйна–Барр, інфекцыйны монануклеёз.

Мэта даследавання: усталяванне заканамернасцяў малекулярна-генетычных механізмаў, звязаных з саматычнай рэкамбінацыяй генаў цяжкіх ланцугоў імунаглабулінаў і актыўнасцю імунаферментаў ЦДА і АДА пры ВІЧ-інфекцыі, ВГС-інфекцыі, ВГЧ-6-інфекцыі, ВЭБ-інфекцыі (востры інфекцыйны монануклеёз і латэнтнае носьбіцтва).

Метады даследавання: імуналагічныя, біяхімічныя, малекулярна-генетычныя, статыстычныя.

Атрыманья вынікі і іх навуковая навізна. У папуляцыях МПК здаровых асоб і пацыентаў з віруснымі інфекцыямі быў выяўлены варыянтны характар саматычнай рэкамбінацыі генаў цяжкіх ланцугоў імунаглабулінаў. Першы варыянт характарызуецца наяўнасцю стандартнага FR1-Ж-фрагмента (часцей выяўляецца ў здаровых асоб), другі варыянт – раўнамернымі суадносінамі фрагментаў генных рэаранжыровак у дыяпазоне ад 200 н.п. да 390 н.п. (часцей выяўляецца ў пацыентаў з ХВГС і вострым інфекцыйным монануклеёзам). Актыўнасць ЦДА сывараткі крыві зніжана адносна здаровых асоб ($1,7 \pm 0,14$ МА/л) пры ВГС-інфекцыі ($1,1 \pm 0,06$ МА/л) і ВГЧ-6-інфекцыі ($0,6 \pm 0,19$ МА/л). Характэрнай рысай пацыентаў з ВІЧ-інфекцыяй з'яўляецца выяўленне асоб без актыўнасці ЦДА ў сываратцы крыві. Актыўнасць АДА ў сываратцы крыві дакладна ніжэй у пацыентаў з ХВГС ($6,8 \pm 0,85$ МА/л) і з ВГЧ-6-інфекцыяй ($4,3 \pm 0,72$ МА/л), чым у здаровых асоб ($10,2 \pm 0,97$ МА/л). Для В-лімфацытаў лініі Daudi, якія маюць латэнтнае носьбіцтва ВЭБ, характэрна павышаная адносна культур МПК экспрэсія групы генаў, звязаных з актыўнасцю цыклін-залежных кіназ.

Рэкамендацыі па выкарыстанні. Прапанаваныя метады даследавання актыўнасці ЦДА і стану саматычнай рэкамбінацыі генаў цяжкіх ланцугоў імунаглабулінаў могуць выкарыстоўвацца ў дадатак да стандартнага імуналагічнага даследавання ва ўстановах аховы здароўя, якія аказваюць дапамогу пацыентам з ВГС-інфекцыяй, інфекцыйным монануклеёзам і ВІЧ-інфекцыяй.

Галіна прымянення: імуналогія, інфекцыйныя хваробы.

РЕЗЮМЕ

Павлов Кирилл Игоревич

Состояние молекулярно-генетических механизмов, контролирующих иммуногенез при вирусных инфекционных заболеваниях человека

Ключевые слова: иммуногенез, соматическая рекомбинация, цитидиндезаминаза, вирус иммунодефицита человека, хронический вирусный гепатит С, вирус Эпштейна–Барр, инфекционный мононуклеоз.

Цель исследования: установление закономерностей молекулярно-генетических механизмов, связанных с соматической рекомбинацией генов тяжёлых цепей иммуноглобулинов и активностью иммуноферментов ЦДА и АДА при ВИЧ-инфекции, ВГС-инфекции, ВГЧ-6-инфекции, ВЭБ-инфекции (острый инфекционный мононуклеоз и латентное носительство).

Методы исследования: иммунологические, биохимические, молекулярно-генетические, статистические.

Полученные результаты и их научная новизна. В популяциях МПК здоровых лиц и пациентов с вирусными инфекциями был выявлен вариантный характер соматической рекомбинации генов тяжёлых цепей иммуноглобулинов. Первый вариант характеризуется наличием стандартного FR1-JH-фрагмента (чаще выявляется у здоровых лиц), второй вариант – равномерными соотношениями фрагментов генных реаранжировок в диапазоне от 200 н.п. до 390 н.п. (чаще выявляется у пациентов с ХВГС и острым инфекционным мононуклеозом). Активность ЦДА сыворотки крови снижена относительно здоровых лиц ($1,7 \pm 0,14$ МЕ/л) при ВГС-инфекции ($1,1 \pm 0,06$ МЕ/л) и ВГЧ-6-инфекции ($0,6 \pm 0,19$ МЕ/л). Характерной чертой пациентов с ВИЧ-инфекцией является выявление образцов без активности ЦДА в сыворотке крови. Активность АДА в сыворотке крови достоверно ниже у пациентов с ХВГС ($6,8 \pm 0,85$ МЕ/л) и с ВГЧ-6-инфекцией ($4,3 \pm 0,72$ МЕ/л), чем у здоровых лиц ($10,2 \pm 0,97$ МЕ/л). Для В-лимфоцитов линии Daudi, имеющих латентное носительство ВЭБ, характерна повышенная относительно культур МПК экспрессия группы генов, связанных с активностью циклин-зависимых киназ.

Рекомендации по использованию. Предложенные методы исследования активности ЦДА и состояния соматической рекомбинации генов тяжёлых цепей иммуноглобулинов могут использоваться в дополнение к стандартному иммунологическому исследованию в учреждениях здравоохранения, оказывающих помощь пациентам с ВГС-инфекцией, инфекционным мононуклеозом и ВИЧ-инфекцией.

Область применения: иммунология, инфекционные болезни.

SUMMARY

Pavlov Kiril Igorevitch

**The state of molecular-genetic mechanisms that control immunogenesis
in viral infectious human diseases**

Key words: immunogenesis, somatic recombination, cytidine deaminase, human immunodeficiency virus, chronic C hepatitis, Epstein-Barr virus, infectious mononucleosis.

Aim of the study: revealing the molecular genetic mechanisms, associated with somatic recombination of immunoglobulins heavy chains genes and CDA and ADA immunoenzymes activity in HIV-infection, HCV-infection, HHV-6-infection, and EBV-infection (acute infectious mononucleosis and latency).

Investigation methods: immunological, biochemical, molecular-genetics, medical-statistics.

Results and their novelty. Somatic recombination of immunoglobulin's heavy chains genes in polyclonal populations of MPBC were characterized by variants. The first variant is distinguished by the presence of a standard FR1-JH fragment (it was more often detected in healthy individuals), the second variant was presented by equal ratio of gene rearrangement fragments in the range of 200 bp. up to 390 bp. (typical for patients with HCV-infection and acute infectious mononucleosis). In comparison with healthy subjects (1.7 ± 0.14 IU/l), the activity of CDA in serum was reduced for HCV-infection (1.1 ± 0.06 IU/l) and HHV-6-infection ($0,6 \pm 0,19$ IU/l). A characteristic feature of patients with HIV-infection is the detection of samples without CDA activity in serum. Serum ADA activity is significantly lower in patients with HCV-infection (6.8 ± 0.85 IU/l) and with HHV-6-infection (4.3 ± 0.72 IU/l) than in healthy subjects (10.2 ± 0.97 IU/l). For B-lymphocytes of Daudi cell line (which have EBV latency), relative to MPBC cultures, was revealed increased expression for group of genes, connected with cyclin-dependent kinases.

Recommendations for use. The proposed methods for studying CDA activity and somatic recombination of immunoglobulin's heavy chains can be used in addition to standard immunological examination by physicians, assisting patients with HCV-infection, infectious mononucleosis and HIV-infection.

Field of application: immunology, infectious diseases.

Репозиторий БГМУ

Подписано в печать 04.05.18. Формат 60×84/16. Бумага писчая «Хероx Office».
Ризография. Гарнитура «Times».
Усл. печ. л. 1,39. Уч.-изд. л. 1,43. Тираж 60 экз. Заказ 292.

Издатель и полиграфическое исполнение: учреждение образования
«Белорусский государственный медицинский университет».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/187 от 18.02.2014.
Ул. Ленинградская, 6, 220006, Минск.