

УДК 303.436.4: 631.867.5: 53.082.4

© Коллектив авторов, 2025

БИОФИЗИЧЕСКАЯ УЛЬТРАЗВУКОВАЯ МОДУЛЯЦИЯ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ – ИННОВАЦИОННАЯ ТЕХНОЛОГИЯ СОВРЕМЕННОЙ КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Пастушенков В.А.¹, Митин Ю.А.²

¹ ФГБУ «СПб НИИ ЛОР» Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Россия

² ООО «Витамед», г. Санкт-Петербург, Россия

Аннотация

Экспериментальными исследованиями показана возможность биофизической ультразвуковой модуляции (дизинтеграции) иммунных комплексов сыворотки крови, с выделением из них иммунологически активных антител. Экстинция сывороток определялась методом иммуноферментного анализа до и после воздействия ультразвуком в течении 5 минут генератором И10-840 в диапазоне частот УЗ 22-44 КГц. Использованы сыворотки крови ВИЧ-инфицированных пациентов. Процессы дезинтеграции иммунных комплексов сопровождались появлением антител и антигенов, ранее находившихся в связанном состоянии и недоступных для выявления лабораторными методами, что проявлялось ростом экстинций сывороток после ультразвукового воздействия. Методика ультразвуковой дезинтеграции иммунных комплексов может быть использована для ранней диагностики, экспертизы и повышения эффективности профилактики заболеваний.

Ключевые слова:

ультразвук, циркулирующие иммунные комплексы, клиническая лабораторная диагностика, ВИЧ-инфекция.

BIOPHYSICAL ULTRASOUND MODULATION OF BLOOD SERUM IMMUNE COMPLEXES IS AN INNOVATIVE TECHNOLOGY FOR MODERN CLINICAL LABORATORY DIAGNOSTICS OF INFECTIOUS DISEASES

Pastushenkov V.L.¹, Mitin Yu.A.²

¹ St. Petersburg Research Institute of Ear, Throat, Nose and Speech of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia

² LLC "Vitamed", St. Petersburg, Russia

Abstract

Experimental studies have shown the possibility of biophysical ultrasonic modulation (disintegration) of blood serum immune complexes, with the isolation of immunologically active antibodies from them. The extinction of the sera was determined by enzyme-linked immunosorbent assay before and after exposure to ultrasound for 5 minutes using an I10-840 generator in the 22-44 kHz frequency range. The sera were obtained from HIV-infected patients. The processes of immune complexes disintegration were accompanied by the appearance of antibodies and antigens that were previously in a bound state and were not detectable by laboratory methods, which manifested itself in the growth of serum extinctions after ultrasonic exposure. The technique of ultrasonic disintegration of immune complexes can be used for early diagnosis, examination, and improving the effectiveness of disease prevention.

Keywords:

Ultrasound, circulating immune complexes, laboratory diagnostics, HIV-infection.

Введение

Иммунная система организма реализует свои функции через механизмы врожденного и приобретенного (адаптивного) иммунитета. Иммунные процессы при врожденном иммунитете основаны на специфическом распознавании паттернов патогенности, обладающих свойствами чужеродности. При адаптивном иммунитете происходит распознавание антигенов с помощью рецепторов лимфоцитов и различных специфических антител. Адаптивный иммунитет имеет преимуще-

ство, отсутствующее у врожденного иммунитета – способность распознавать любые, даже измененные антигены, защищать организм от агрессии не только снаружи, главным образом от инфекций, но и изнутри, чаще всего от злокачественных новообразований.

В организме в результате процесса иммунной реакции происходит соединение антигенов со специфическими к ним антителами, т.е. образуются циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК). Кроме двух основных компонентов ЦИК

антигенов и специфических к ним антител в состав иммунных комплексов могут включаться молекулы, способные связываться с определенными участками уже связанных с антигеном антител. Это могут быть молекулы белков системы комплемента или анти-глобулиновые факторы. Формирование иммунных комплексов, содержащих различные антигены и антитела, представляет собой важный иммунологический феномен, в значительной степени определяющий течение патологического процесса при различных заболеваниях. Этот процесс, при вирусных инфекциях, например, служит одним из механизмов нейтрализации биологической активности вирусов [1]. В одних случаях это, происходит с участием белков системы комплемента, что приводит к необратимым изменениям в структуре вирусных частиц и потере ими инфекционности. В других случаях нейтрализация происходит путем пространственной блокады молекулами антител поверхности вируса. В такой капсуле, состоящей из молекул антител, вирусы могут сохранять неизменной свою структуру и функции, а после диссоциации ЦИК, вновь обретать способность инфицировать чувствительные к ним клетки [2,3].

Разнообразие факторов, способных влиять на прочность комплексов и индуцировать их диссоциацию (дезинтеграцию) объясняется гетерогенным характером связей, принимающих участие во взаимодействии вирусных антигенов с антителами.

Возникающая в естественных условиях диссоциация ЦИК рассматривается как одна из причин формирования так называемой персистирующей инфекционной фракции, способствующей развитию хронических форм вирусных заболеваний.

Взаимодействие вирусных антигенных детерминант со специфическими антителами осуществляется при помощи всех видов связей, характерных для белковых молекул: водородных, ван-дер-ваальсовых дисперсионных сил притяжения, электростатического притяжения, возникающего между положительно и отрицательно заряженными группами, дипольных сил и гидрофобных связей. Эти связи характеризуются незначительной энергией и действуют на минимальном расстоянии. Таким образом, прочность иммунных комплексов зависит как от числа таких связей, так и от конформационного соответствия эпитопа антигена активному центру антитела. На прочность таких иммунных комплексов влияет температура и Ph растворов. Так, уровень активной диффузии, возрастает для при температуре 37 градусов С и выше. К таким же последствиям приводит и изменение pH среды ниже 6,0 или выше 8,5, что, однако, сказывается не только на межмолекулярных связях, но и на изменении конформации активных центров антител, снижая в дальнейшем, например, возможности иммунного реагирования конформационно измененных антител, со специфическими антигенами.

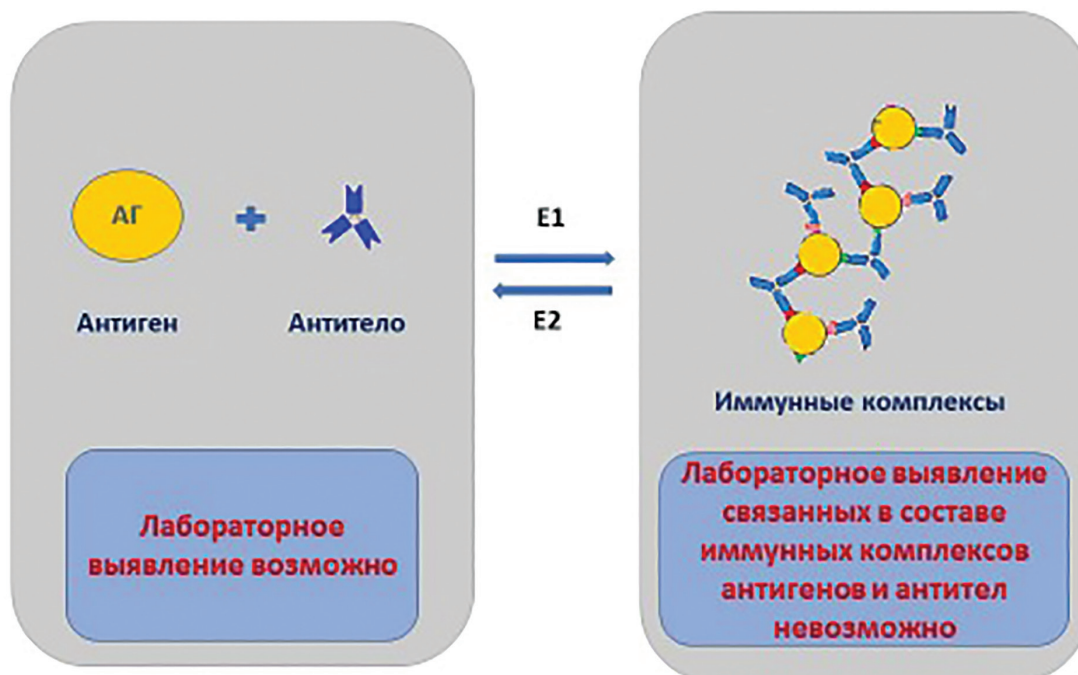


Рис. 1. Схема образования иммунного комплекса и возможности лабораторного выявления антител из их состава

Одним из первых этапов защиты организма является взаимодействие антигенов вируса с так называемыми естественными антителами, которые представляют собой низко-аффинные и полиреактивные антитела, на невысоком уровне присутствующие в организме и имеющие возможность связываться с разнообразными антигенами многих вирусов, осуществляя связь между врожденным и приобретенным иммунным ответом, ограничивая распространения вируса (рис.1). Эти сложные конструкции: иммунный комплекс (ЦИК) из естественных антител и антигенов вируса осуществляют презентацию вирусных антигенов во вторичные лимфоидные органы, инициируя реализацию адаптивного иммунного ответа [4]. Кроме того, комплемент, компоненты комплемента C3, C4, C1q, присутствующие в иммунных комплексах, связанные со своими рецепторами, определяют эффективность представления антигена во вторичные лимфоидные органы [5,6,7].

Ранняя диагностика инфекционных, онкологических, аутоиммунных, аллергических заболеваний представляет собой одну из актуальных задач современной клинической лабораторной диагностики. В случае с тяжелыми, особенно смертельно опасными инфекционными заболеваниями, например, ВИЧ-инфекцией, чем раньше будет установлен диагноз, следовательно, быстрее и эффективнее может быть организована профилактика инфекции [8].

Наиболее важным положением руководящих документов лабораторной службы РФ в отношении диагностики ВИЧ-инфекции является следующее: «Стандартным методом лабораторной диагностики ВИЧ-инфекции служит определение антител/антигенов к ВИЧ с помощью ИФА. Для подтверждения результатов в отношении ВИЧ применяются подтверждающие тесты (иммунный, линейный блот)».

Таким образом основным лабораторным методом, использующимся для реализации стратегии скрининга, является иммуноферментный (ИФА). Одной из проблем, возникающей при первичном лабораторном обследовании пациента, особенно в начальный период развития ВИЧ-инфекции, является возможность получения ложноотрицательных результатов [9]. Это явление чаще может иметь место в период так называемого «серонегативного периода» или «серологического окна», возникающего на ранних этапах инфекции, когда инфицирование произошло относительно недавно, уровень антител низкий и образовавшиеся антитела связавшись с антигенами ВИЧ, образуют иммунные комплексы (рис.2).

Изучение ЦИК при ВИЧ-инфекции показало, что у 87–89% пациентов основная доля ЦИК представлена IgG-содержащими комплексами. остальные содержали Ig M антитела. У больных с ВИЧ-инфекцией содержание Ig G в составе ЦИК было существенно выше, по сравнению с его уровнем у здоровых лиц. В другом исследе-

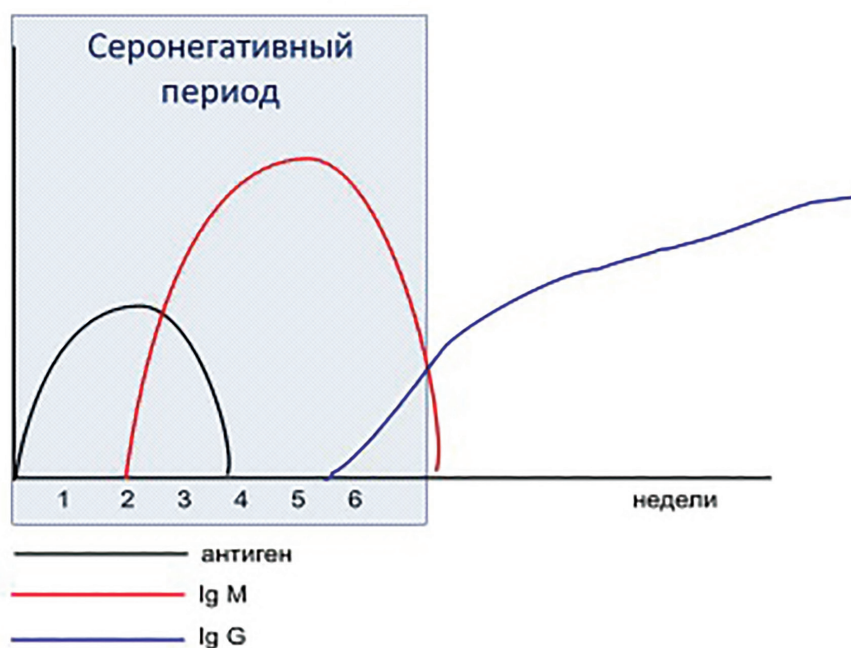


Рис. 2. Серонегативный период на ранних стадиях развития инфекционных, онкологических заболеваний и аутоиммунных процессов

довании был проведен сравнительный анализ частоты встречаемости «свободных» антител и «связанных» с белками вируса в циркулирующие иммунные комплексы в сыворотках крови больных ВИЧ инфекцией в ранний период заболевания [11]. В соответствии с рекомендациями ВОЗ по интерпретации результатов иммунного блота, авторами данного исследования были выделены 20 проб с сомнительными результатами и 26 проб с положительными результатами иммуноблота. Несмотря на то, что сыворотки крови были получены в разные сроки диспансерного наблюдения больных ВИЧ инфекцией, тем не менее, в первой группе, в основном, выявлялись антитела к gp160, p55, p25, а во второй группе еще и к gp120, p68 и p52. Причем, в группе с положительными результатами иммуноблота частота встречаемости антител к gp160, gp120 и p25 в сыворотках крови составила 100%. Титры «свободных» антител к ВИЧ у пациентов первой группы изменялись, по данным ИФА, в диапазоне от 1:4 до 1:128, а у пациентов второй группы они находились в диапазоне от 1:256 до 1:4096, соответственно. Эти исследования подтверждают сведения о том, что, динамика инфекционного процесса сопровождается нарастанием титра «свободных» антител к ВИЧ уже на ранних этапах заболевания [12].

Есть ли возможность провести такое воздействие на ЦИК сыворотки крови у больных ВИЧ-инфекцией, чтобы вызвать их распад, получить из их состава свободные антигены и антитела, при условии сохранения ими биологической активности и возможности участия в иммунных

реакциях? Нам представляется, что методически работа должна быть направлена на поиск воздействия, наиболее физиологически щадящего биологические объекты, в том числе ЦИК сыворотки крови, а также входящие в ЦИК антитела и антигены. Одним из наиболее перспективных методов, отвечающим этим условиям, является ультразвуковое воздействие. При воздействии ультразвука на жидкие биологические среды происходит возникновение важнейшего эффекта – кавитации, определяемой как образование одного или нескольких пузырьков газа (полостей) в объеме жидкости. Процессы кавитации, возникающие в жидкой биологической среде под действием ультразвука, приводят к усилению в ней химических процессов, формированию различных радикалов, и, следовательно, к изменению состояния макромолекул, находящихся в данной биологической среде. Возникающие химические и термодинамические процессы реализуются в виде диссоциации макромолекул с возможностью их последующей рекомбинации, сопровождающейся явлениями хемилюминесценции.

Результатом такого воздействия может стать разделение макромолекул, т.е. распад иммунного комплекса на его составляющие – антигены и антитела. Появление свободных антигенов и антител, ранее находившихся в связанном состоянии, может быть использовано в диагностических целях (рис.3).

Такие свободные антигены и антитела уже могут быть выявлены методами иммуноанализа – ИФА, иммунным блотингом, иммунохемилюминесцентным анализом [13,14,15].



Рис. 3. Схема высвобождения антигенов и антител, при ультразвуковой дезинтеграции циркулирующих иммунных комплексов

Цель исследования. Изучение возможности использования технологии ультразвуковой модуляции (дезинтеграции) иммунных комплексов сыворотки крови в клинической лабораторной диагностике инфекционных заболеваний.

Материалы и методы. В исследование включены образцы сыворотки крови от инфицированных ВИЧ лиц, находящихся под диспансерным динамическим наблюдением в ГКУЗ Ленинградской области "Центр СПИД", г. Санкт-Петербург. Для каждого образца сыворотки крови ранее в ГБУЗ «Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», г. Санкт-Петербург были получены первично-положительные результаты в иммуноферментной (ИФА) тест-системе, подтвержденные затем положительными результатами исследований методом иммунного блота (ИБ). Для назначения и контроля проводимой антиретровирусной терапии пациенты были обследованы с помощью количественного определения РНК ВИЧ-1 методом ПЦР в реальном времени. Работа была выполнена с использованием нижеперечисленных тест-систем, при соблюдении соответствующих протоколов производителей:

-ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo (Abbott, США), иммунохемилюминесцентный анализ.

-NEW LAV BLOT I (Bio-Rad, США), лизатный иммунный блот (ИБ)

-ВИЧ-1 p24-антиген-ИФА-БЕСТ (Вектор-Бест, РФ), иммуноферментный анализ;

-Abbott RealTime HIV-1 (Abbott, США), ПЦР в реальном времени.



Рис. 4. Экспериментальная ультразвуковая лабораторная установка И-100-840

Экспериментальные исследования были проведены на специально оборудованном испытательном стенде, включающем комплект тестовых образцов сывороток крови в пластиковых пробирках с объемом биологической среды 1,0-1,8 мл, ультразвуковой лабораторной установки И100-840 (Россия), средств защиты от образования аэрозольного облака и дезинфекции (рис.4).

Для исследования образцы сыворотки крови, помещались в пробирки типа Эпендорф (производитель Aptaka S.P.A. (Италия), материал полипропилен, объем 1,5 мл, диаметр 10,5 мм, высота 40 мм. Для проведения ультразвукового исследования лабораторная установка использовалась в диапазоне частот 20-50 КГц с различными вариантами мощности воздействия (10-100%) и временными параметрами воздействия от 30 до 300 секунд.

Результаты и их обсуждение.

Методически исследование было направлено на изучение уровней экстинций 19 позитивных по наличию специфических антител к ВИЧ сывороток крови, до и после ультразвукового воздействия. Под экстинцией понималась оптическая плотность исследуемых сывороток крови, регистрируемая спектрофотометром, до и после проведения иммуноферментного анализа. Критерием позитивности являлся уровень экстинций cut off, полученный в исследовании. Превышение критического порога (cut off) экстинции сыворотки, свидетельствовало о наличии выявляемых анализом антител. Чем выше был уровень экстинции, тем больше в сыворотке крови находилось выявляемых антител.

Изменения, связанные с ростом экстинций, позитивных по наличию специфических антител к ВИЧ сывороток крови, были отмечены в 7 случаях из 19. Результаты исследований, приведенные в таблицах 1 и 2, были получены в следующих условиях ультразвукового воздействия: характеристика относительной мощности ультразвукового воздействия находилась в диапазоне 50-100%, время воздействия составило 180-300 сек., частота 22-44 КГц. Полученные при экспериментальном ультразвуковом воздействии результаты, приведены в таблице 1.

Как следует из приведенной таблицы 1, наибольший абсолютный прирост экстинций отмечен для сывороток под номерами 2 (1,208) и 6 (1,255). Остальные значения имели относительно небольшой прирост экстинций (от 0,010 до 0,179). Результаты исследований также были проанализированы в отношении абсолютного прироста эк-

стинций, а также относительного (%) их изменения, при этом в качестве сравнения использованы уровни экстинций до воздействия и уровень экстинций cut off (табл.2).

Важность данных, полученных в сравнительном анализе, характеризуется тем, что демонстрирует преодоление порога позитивности, по-

казывая прирост уровней экстинций, по отношению к cut off. Наибольшие изменения в процентном отношении составили 475,59 и 529,53, что является 4-5 кратным превышением уровня, необходимого для признания данной сыворотки крови позитивной в отношении специфических антител и антигенов ВИЧ.

Таблица 1

Характеристика уровней экстинций, позитивных по наличию специфических антител к ВИЧ сывороток крови, до и после ультразвукового воздействия

№ п.п	Уровень экстинции до УЗ воздействия (ОП/ cut off)	Время УЗ воздействия (сек)	Мощность установки (%)	Диапазон частот УЗ (КГц)	Уровень экстинции после УЗ воздействия (ОП/ cut off)
1	4,765/0,254	180-300	100	22-44	4,944/0,254
2	4,749/0,254	180-300	50	22-44	5,957/0,254
3	4,862/0,254	180-300	50	22-44	4,971/0,254
4	4,642/0,237	180-300	50	22-44	4,652/0,237
5	5,044/0,237	180-300	50	22-44	5,083/0,237
6	4,685/0,237	180-300	50	22-44	5,940/0,237
7	0,5596/0,218	180-300	50	22-44	0,5781/0,218
8	0,4285/0,218	180-300	50	22-44	0,4437/0,218

Таблица 2

Характеристика абсолютной и относительной величины изменений экстинций, позитивных по наличию специфических антител к ВИЧ сывороток крови, до и после ультразвукового воздействия

№ п.п	Уровень экстинции до УЗ воздействия (ОП/ cut off)	Уровень экстинции после УЗ воздействия (ОП/ cut off)	Прирост экстинции после УЗ воздействия (абс)	Прирост экстинции после УЗ воздействия (общий / cut off, %)
1	4,765/0,254	4,944/0,254	0,179	3,75 / 70,47
2	4,749/0,254	5,957/0,254	1,208	25,43 / 475,59
3	4,862/0,254	4,971/0,254	0,109	2,24 / 42,91
4	4,642/0,237	4,652/0,237	0,010	0,25 / 4,22
5	5,044/0,237	5,083/0,237	0,039	0,76 / 16,45
6	4,685/0,237	5,940/0,237	1,255	26,79 / 529,53
7	0,5596/0,218	0,5781/0,218	0,185	3,31 / 84,86
8	0,4285/0,218	0,4437/0,218	0,152	3,54 / 69,72

Заключение.

Полученные в экспериментальном пилотном исследовании данные подтверждают возможность получения эффекта ультразвуковой дезинтеграции иммунных комплексов, содержащих специфические антитела и антигены ВИЧ, с возможностью их дальнейшего обнаружения методами лабораторной диагностики – иммунофлюоресцентным и иммуноферментным анализом. Такая возможность наиболее необходима при лабораторной диагностике инфекционных заболеваний в острый период, при дефиците свободных антител и антигенов в циркуляции [16]. Технологическая новация по повышению качества лабораторной диагностики такого социально-значимого заболевания, как ВИЧ-инфекция, была продемонстрирована с целью подтверждения возможности более ранней диагностики инфекций, что может служить основанием для ее внедрения в практику.

Литература

1. Беляков Н.А. Вирус иммунодефицита – опасность для человека Санкт-Петербургский Гуманитарный университет профсоюзов. Санкт-Петербург, 2020. Сер. 206 Избранные лекции Университета.
2. Покровский В.В. ВИЧ-инфекция и СПИД / ред. В.В. Покровский. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 192 с.
3. Ochsenbein, A. F. et al. Correlation of T cell independence of antibody responses with antigen dose reaching secondary lymphoid organs: implications for splenectomized patients and vaccine design. J. Immunol. 164, 2000, Pp. 6296-6302.
4. Kopf, M., Abel, B., Gallimore, A., Carroll, M. & Bachmann, M.F. Complement component C3 promotes T-cell priming and lung migration to control acute influenza virus infection. Nature Med. 8, 2002. Pp. 373-378.
5. Бартлетт Дж. Клинические аспекты ВИЧ-инфекции 2012/ Бартлетт Дж., Галлант Дж., Фам П. — М.: Р. Валент, 2012. 528 с.
6. Douek D.C., Roederer M., Koup R.A. Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS // Annu.Rev. Med, 2009. Vol.60. Pp. 471-484.
7. Liu P., Overman G. R., Yates N.L., et al. // J. Virol.2011. V. 85. Pp. 11196–11207.
8. Лисицына З.Н., Дмитриевская К.А., Коробан Н.В., Кондрашова Т.В. Иммунные тесты и диагностика острой стадии ВИЧ-инфекции // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессия, 2017, Т.9. №2. С. 36-41.
9. Королевская Л.Б., Шмагель К.В., Шмагель Н.Г. Характеристика циркулирующих иммунных комплексов у ВИЧ-инфицированных пациентов с различным уровнем вирусной нагрузки. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2015. Т. 159. № 4. С. 460-463.
10. Галиуллин Н.И., Нагимова Ф.И., Семенова Л.В., Коксин В.П. Изучение спектра белков ВИЧ в циркулирующих иммунных комплексах сыворотки крови при ВИЧ-инфекции. В сборнике: Актуальные вопросы ВИЧ-инфекции. Материалы Международной научно-практической конференции, 2019. С. 241-242.
11. Рязанова Г.А., Коксин В.П., Хамзина Р.В. "Свободные" и "связанные" антитела к структурным белкам ВИЧ-1 в ранний период заболевания. Медицинская иммунология, 2005. Т. 7. № 1. С. 73-76.
12. Сапрыгин Д.Б. Лабораторная диагностика инфекционных болезней. Справочник // Д.Б. Сапрыгин, А.М. Иванов — М., 2016. 648 с.
13. Финогеев Ю.П. Клинико-лабораторная диагностика инфекционных болезней. Руководство для врачей // Финогеев Ю.П., Ю.В. Лобзин, Ю.А., С.М. Захаренко [и др]. — СПб., 2001. 384 с.
14. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению ВИЧ-инфекции у взрослых / А.И. Мазус [и др.]. М., 2014. 75 с.
15. Mitin Yu.A, Pastushenkov V.L, Emanuel V.L., Gabaeva M.M. Biophysical modulation as a technological stage of in vitro studies of the biochemical composition of biological objects // HIV Infection and Immunosuppressive Disorders. 2021. Vol. 13, No. 3. P. 134–138, <http://dx.doi.org/10.22328/2077-9828-2021-13-3-134-138..>

Контакты авторов:

Пастушенков Владимир Леонидович
e-mail: pastprof@mail.ru

Конфликт интересов: отсутствует