

Л.И. Мордовская, М.А. Владимирский, Л.К. Шипина,
Е.И. Аксенова, А.Ю. Сазыкин

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ИНДУКЦИИ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ КЛЕТКАМИ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ EX VIVO В ПРИСУТСТВИИ АНТИГЕНОВ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА

УДК 616.24-002.5-078.33

Изучена эффективность применения метода индукции фактора некроза опухоли (ФНО- α) в образцах цельной крови в присутствии антигенов микобактерий туберкулеза: туберкулина PPD и смеси специфических рекомбинантных антигенов ESAT-6 и CFP-10 для дифференциальной диагностики активной туберкулезной инфекции. Разработана собственная тест-система иммуноферментного анализа для количественного определения ФНО- α в образцах плазмы крови. На материалах исследований образцов крови 46 подростков с туберкулезным инфицированием (латентной инфекцией) и активным туберкулезом легких показана возможность дифференцирования активного туберкулеза от латентной инфекции при использовании антигенов ESAT-6 и CFP-10 в качестве индуктора ФНО- α .

Ключевые слова: дети и подростки, туберкулеза, фактора некроза опухоли, антигены.

We studied an efficacy of whole-blood method of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) induction in the presence of Mycobacterium tuberculosis antigens (tuberculin PPD and a mixture of specific recombinant ESAT-6 and CFP-10 antigens), for differential diagnosis of active tubercular infection. A customized test system with immunoenzyme assay was developed, to quantify TNF-alpha in plasma samples. Based on findings of blood sample investigations in 46 adolescents with tubercular infection (latent infection) and active pulmonary tuberculosis, the study demonstrated the possibility of differentiation between active and latent tubercular infection, using ESAT-6 and CFP-10 antigens as TNF-alpha inducers.

Keywords: children, adolescents, tuberculosis, tumor necrosis factor, antigens.

Методы иммунодиагностики применяются во фтизиатрии с целью диагностики и дифференциальной диагностики туберкулеза, для уточнения активности туберкулезного процесса, для разграничения инфекционной и поствакцинальной аллергии, для контроля за эффективностью лечения и определения прогноза заболевания.

Значение ФНО- α в реализации противотуберкулезного иммунитета наглядно демонстрируется реактивацией туберкулезной инфекции при лечении больных ревматоидным артритом с помощью гуманизированных моноклональных антител – инфликсимаб (коммерческое название – ремикейд) [8]. ФНО ответственен за образование и поддержание структуры гранулемы, ограничивающей распространение туберкулезной инфекции [9]. Однако механизм участия ФНО- α в антимикобактериальной резистентности, очевидно, существенно

сложнее. Было показано, что Т-клетки-эффекторы CD8+CD45RA+, обеспечивающие с помощью гранулизина лизис макрофагов, инфицированных микобактериями, несут на клеточной мембране молекулы ФНО- α . В связи с этим антитела к ФНО- α при участии комплемента лизируют эти клетки и блокируют антимикобактериальный эффект [1]. Уровни антиген-индуцированного ФНО- α , в отличие от индуцированного ИФН- γ , не угнетаются при распространенных процессах туберкулеза легких [5], но индуцируются при активной туберкулезной инфекции в более высоких концентрациях, чем при латентной инфекции [6].

Цель исследования – анализ антиген-индуцированной продукции ФНО- α в образцах цельной крови при различных формах и стадиях туберкулезной инфекции.

Материалы и методы. Изучены следующие группы пациентов (46 чел) подросткового (14-17 лет) возраста: впервые инфицированные МБТ («вираж» туберкулиновой пробы) – 8 чел., ранее инфицированные МБТ, не более 2 лет, подростки с положительной пробой Манту – 10, больные активным туберкулезом легких – 20, пациенты с ограниченными формами туберкулеза в фазе уплотнения и кальцинации – 8 чел.

Определение антиген-индуцированной продукции ФНО- α .

Изучали образцы цельной крови по 3,5 мл с гепарином (20 ед/мл), которые

разливали в 3 пробирки (стерильные криопробирки объемом 5 мл с завинчивающимися крышками) по 1 мл, из которых одна была контрольной, во 2-ю и 3-ю пробирки заранее вносили по 10 мкл антигенов туберкулина PPD и смесь рекомбинантных антигенов ESAT-6 и CFP-10 соответственно. Каждый из антигенов вносили в дозе 10 мкг (по белку). Специфические рекомбинантные пептиды, связанные с целлюлозо-связывающим доменом, составляли около 20% суммарной массы вносимых антигенов.

Для количественного определения ФНО- α в образцах надосадочной плазмы после инкубации цельной крови была разработана иммуноферментная тест-система. В качестве сорбирующего реагента в лунках полистиролового иммунологического планшета использовали поликлональные кроличьи антитела, полученные после 5-кратной (каждые две недели) иммунизации кроликов рекомбинантным ФНО- α человека. Препарат IgG кролика получали с помощью аффинной хроматографии на колонке Protein A Sepharose FF. Титры антител против ФНО- α в прямом ИФА были не менее 1:200 000. В качестве детектирующих антител использовали моноклональные антитела F10 против ФНО- α [2], очищенные на Protein A Sepharose FF и меченые биотином. Выявление проводили при помощи стрептавидин-пероксидазы фирмы Sigma. В качестве

МОРДОВСКАЯ Лариса Ивановна – д.м.н., с.н.с. ГУ НПЦ «Фтизиатрия» МЗ РС (Я), limordovskaya@mail.ru; **ВЛАДИМИРСКИЙ Михаил Александрович** – д.м.н., проф., руковод. лаб. НИИ фтизиопульмонологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова; **ШИПИНА Любовь Климовна** – к.б.н., с.н.с. НИИ фтизиопульмонологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова; **АКСЕНОВА Екатерина Ивановна** – н.с. НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи МЗ и СР; **САЗЫКИН Алексей Юрьевич** – к.б.н., доцент НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова.

субстрата для пероксидазы применяли ортофенилендиамин (ОФД).

Калибровочная кривая строилась путем последовательных двукратных разведений с использованием концентраций стандартного рекомбинантного ФНО- α от 23,2 нг/мл до 0,05 нг/мл. Для анализа в лунки планшета в повторях наносили по 50 мкл жидкости для разведения образцов и по 50 мкл изучаемых образцов плазмы.

Учет реакции проводили количественно с помощью иммуноферментного анализатора «Пикон» (Россия).

Чувствительность анализа составляла 0,09 нг/мл. Уровень определяемых значений ФНО- α во всех антиген-индуцированных образцах существенно превышал уровень чувствительности тест-системы.

Статистические оценки межгрупповых различий проводили с помощью программы SPSS с использованием параметрического t – критерия Стьюдента и непараметрического критерия Вилкоксона.

Результаты и их обсуждение. Результаты исследований антиген-индуцированной продукции ФНО- α у 46 пациентов подросткового возраста представлены в таблице.

В соответствии с полученными данными у подростков, впервые инфицированных МБТ с предполагавшейся первичной туберкулезной инфекцией, уровень концентраций ФНО- α , индуцированного туберкулином PPD, был достоверно выше, чем у ранее инфицированных или эффективно пролеченных пациентов с относительно небольшими формами туберкулеза (первичный туберкулезный комплекс, инфильтративный туберкулез легких, ограниченный в пределах одного сегмента, в фазе уплотнения). Подобные результаты для сравниваемых форм туберкулезной инфекции наблюдаются и при индукции ФНО- α смесью антигенов ESAT-6 и CFP-10, однако в этих опытах было установлено, что уровень индукции ФНО- α у больных активным туберкулезом легких существенно превышает ($6,2 \pm 0,6$ нг/мл) уровень индуцированного ФНО- α в группе впервые инфицированных – $3,0 \pm 0,3$ нг/мл.

Представленные данные свидетельствуют о том, что уровень антиген-индуцированной продукции ФНО- α отражает степень активности туберкулезной инфекции. Очень высокий уровень индуцированного ФНО- α наблюдался у пациентов с фиброзно-кавернозным туберкулезом легких – 14,1 нг/мл, а также при инфильтративном туберкулезе в сочетании с экс-

Индукция ФНО- α в образцах цельной крови, инкубированных с антигенами МБТ

Группа пациентов	ФНО- α , нг/мл			
	Туберкулин PPD	p	Смесь антигенов: ESAT-6 и CFP-10	p
Впервые инфицированные МБТ n=8	$3,8 \pm 0,6$	$p_{1-2} < 0,01$	$3,0 \pm 0,3$	$p_{1-4} < 0,01$
Ранее инфицированные МБТ n=10	$0,8 \pm 0,2$		$1,4 \pm 0,2$	$p_{1-2} < 0,01$
Активный туберкулез легких n=20	$3,85 \pm 0,6$	$p_{3-4} < 0,05$	$6,2 \pm 0,6$	$p_{1-3} < 0,01$ $p_{3-4} < 0,001$
Малые формы в фазе уплотнения и кальцинации n=8	$1,45 \pm 0,28$	$p_{2-4} < 0,05$	$2,2 \pm 0,3$	$p_{2-4} = 0,02$

судативным плевритом – 9,13 нг/мл. У пациента А. с инфильтративным туберкулезом легких с сопутствующим ревматоидным артритом, получавшего препарат ремикейд (инфликсимаб), содержащий специфические антитела к ФНО- α , индукция ФНО- α антигенами PPD и смесью ESAT-6 и CFP-10 все же наблюдалась, однако была низкой: 0,25 и 0,6 нг/мл соответственно.

Возможность дифференцирования латентной инфекции от активной на основании индукции ФНО- α с использованием в качестве индуктора туберкулина PPD впервые была показана Stern J.N. и соавторами [6].

Полученные нами данные о значительных различиях между пациентами с неактивными формами туберкулеза и больными с активным туберкулезным процессом коррелируют также с недавно опубликованными результатами исследований нескольких авторов [3-7] о различиях между активной и латентной туберкулезной инфекцией и об уменьшении уровня антиген-индуцированной продукции ФНО- α при эффективном лечении и снижении микобактериовыделения. Очевидно, что иммунологический мониторинг как анализ специфического иммунного ответа в течение заболевания и лечения туберкулеза, проводимый на основе системы исследования антиген-индуцированной продукции различных цитокинов, может дать важные характеристики для оценки течения процесса и его прогноза.

Обращает на себя внимание, что уровень антиген-индуцированного ФНО- α у больных, прошедших основной курс лечения, остается высоким, а у нескольких больных с большими остаточными изменениями этот показатель был относительно выше остальных в группе с неактивным туберкулезом.

Следует также отметить, что необходимость слежения за возможной активизацией туберкулезной инфекции у пациентов с посттуберкулезными изменениями в легких, инфицированных ВИЧ, также требует развития анало-

гичного нового лабораторного метода, пригодного для широкого применения в клинической практике. В этом плане перспектива применения технологии Lumiplex как автоматизированной технологии для определения цитокинов, в том числе ФНО- α , в антиген-индуцированных образцах крови существенно увеличит и уточнит эффективность применения этого подхода для контроля за туберкулезной инфекцией.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования метода определения антиген-специфической индукции фактора некроза опухоли в образцах цельной крови *ex vivo* в диагностике туберкулезной инфекции:

- для дифференцирования активной и латентной туберкулезной инфекции;
- для иммунологической оценки излеченности туберкулезного процесса;
- для дифференциальной диагностики туберкулеза и неспецифических заболеваний легких.

Литература

1. Anti-TNF immunotherapy reduces CD8+ T cell-mediated antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* in humans / H. Bruns [et al.] // J. Clin. Invest. – 2009. – Vol.119(5). – P. 1167–1177.
2. Characterization of the Genes Encoding Variable Light and Heavy Chains of the High-Affinity Monoclonal Antibody Against Human Tumor Necrosis Factor / B.V. Radko [et al.] // Russian journal of Immunology – 2002. – Vol.7, № 4. – P. 371-374.
3. Dynamic changes in pro- and anti-inflammatory cytokine profiles and gamma interferon receptor signaling integrity correlate with tuberculosis disease activity and response to curative treatment / E. Sahiratmadja [et al.] // Infect. Immun. – 2007. – Vol. 75, №2. – P. 820-829.
4. Increased IgG1, IFN-gamma, TNF-alpha and IL-6 responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigens in patients with tuberculosis are lower after chemotherapy / A.M. Mattos [et al.] // Int. Immunol. – 2010. – Vol.22 (9). – P. 775-782.
5. Influence of disease severity on nitrite and cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with pulmonary tuberculosis (TB) / D.Dlugovitzky [et al.] // Clin. Exp. Immunol. – 2000. – Vol. 122, №3. – P. 343–349.

6. Molecular signatures distinguishing active from latent tuberculosis in peripheral blood mononuclear cells, after in vitro antigenic stimulation with purified protein derivative of tuberculin (PPD) or Candida: a preliminary report / J.N. Stern [et al.] // Immunol Res. – 2009. – Vol. 45, No. 1. – P. 1-12.

7. Pattern and diversity of cytokine production differentiates between Mycobacterium tuberculosis infection and disease / J.S. Sutherland [et al.] // Tuberculosis. – 2009. – Vol. 89 (2). – P.136-141.

8. Treatment of rheumatoid arthritis with tumor necrosis factor inhibitors may predispose

to significant increase in tuberculosis risk: a multicenter active-surveillance report / J.J. Gomez-Reino [et al.] // Arthritis Rheum. – 2003. – Vol. 48. – P. 2122–2127.

9. Tumor necrosis factor and tuberculosis / P.L. Lin [et al.] // J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. – 2007. – Vol.12 (1). – P. 22-25.

А.Н. Бадасян, А.А. Сысолятин, М.А. Штарберг, А.А. Сергиевич ПЕРСПЕКТИВА ПРОГНОЗИРОВАНИЯ СТЕПЕНИ СПАЙКООБРАЗОВАНИЯ У БОЛЬНЫХ ПОСЛЕ ОПЕРАЦИИ НА ОРГАНАХ БРЮШНОЙ ПОЛОСТИ

УДК 617.55 -036-089

Представлены диагностические возможности N- ацетилтрансферазы при прогнозировании степени возможного спайкообразования в брюшной полости в раннем послеоперационном периоде. Установлено, что в послеоперационном периоде происходит повышение уровня N-ацетилтрансферазы у больных в моче по сравнению с дооперационным периодом. Особенно выражена разница между уровнями фермента у больных, где оперативное лечение сопровождалось наибольшим травматизмом.

Ключевые слова: прогнозирование, N – ацетилтрансфераза, спайкообразование.

Diagnostic capability of N-acetyltransferase in prognosing the extent of possible adhesions in the abdominal cavity in the early postoperative period is presented. It was established that in the postoperative period the level of N-acetyltransferase was increased in the urine of patients compared with the preoperative period. The difference between levels of enzyme in patients where operative treatment was accompanied by the greatest injury is especially expressed.

Keywords: forecasting, N-acetyltransferase, adhesion formation.

Несмотря на успехи и достижения современной медицины, спаечная болезнь в настоящее время остается одной из нерешенных и актуальных проблем хирургии. Частота заболевания, трудности своевременного распознавания, отсутствие четких критериев лечебной тактики и во многом неудовлетворительные исходы делают проблему спаечного синдрома постоянно актуальной [2,6-9]. За последние десятилетия предложено множество способов диагностики спаечной болезни, однако все эти методы являются относительными и направлены в основном на распознавание, а не на прогнозирование патологии, что не дает возможности хирургу с большей достоверностью проводить мероприятия по профилактике спайкообразования в брюшной полости в раннем послеоперационном периоде.

В последнее время при изучении патогенеза развития внутрибрюшинных спаек выявлено, что фибриллогенез соединительной ткани в основном определяется генетически детерминированным полиморфизмом по фенотипу N-ацетилтрансферазы, которая

переносит ацетильную группу с молекулы ацетилэнзима на первичную аминогруппу различных субстратов, в том числе глюкозамина и галактозамина, ее основная функция — ацетилирование продуктов метаболизма.

N-ацетилтрансфераза является конституциональным ферментом, по активности которого в организме люди делятся на 2 группы: с фенотипом быстрого и медленного ацетилирования.

Клеточные и волокнистые элементы соединительной ткани погружены в основное внеклеточное вещество — протеогликаны, метаболизм которых определяется ферментом N-ацетилтрансферазой. Исследователями Гладких С.П. [1], Магалашвили Р.Д. [3] доказано, что у людей с фенотипом быстрого ацетилирования биосинтез внеклеточного компонента соединительной ткани превалирует над ее катаболизмом, т.е. процесс образования спаечных сращений превалирует над процессом их лизиса. При нанесении таким больным травмы в брюшной полости развивается выраженный спаечный перивисцерит. И, наоборот, у людей с фенотипом медленного ацетилирования замедлен биосинтез внеклеточного компонента соединительной ткани по сравнению с ее катаболизмом. У этих больных спаечный процесс (даже при повторных травмах) незначительный или вовсе отсутствует [2,3]. Таким образом, авторами Гладких С.П. [1], Подымовым В.К.

[5] определено, что одной из причин повышенной склонности к спайкообразованию является ацетилирующая активность организма; повреждение брюшины, операция, воспаление являются неспецифическим разрешающим фактором, “пусковым механизмом” чрезмерного биосинтеза внеклеточного компонента соединительной ткани. Учитывая результаты этих исследований, можно с большой вероятностью предположить, что спаечный перивисцерит в брюшной полости является самостоятельным заболеванием, генетически детерминированным конституциональным ферментом N-ацетилтрансферазой, и ключевая роль в аномальном развитии соединительной ткани в брюшной полости принадлежит этому ферменту.

Целью нашего исследования явилось выявление у оперированных больных корреляции активности N-ацетилтрансферазы в зависимости от травматичности операции и выраженности спаечного процесса в брюшной полости в раннем послеоперационном периоде.

Материалы и методы исследования. Исследование проводилось на 23 пациентах, поступивших в хирургическое отделение МУЗ ГКБ г. Благовещенска на плановые оперативные вмешательства. Возраст больных колебался от 31 до 72 лет. Женщин было 14 (60,86%), мужчин — 9 (39,14 %).

В 65,21% случаев у больных в анам-

ГОУ ВПО Амурская государственная медицинская академия Росздрава: **БАДАСЯН Армен Нерсесович** — аспирант, arm_bad@mail.ru; **СЫСОЛЯТИН Арнольд Антонович** — к.м.н., доцент, зав. кафедрой; **ШТАРБЕРГ Михаил Анатольевич** — к.м.н., ст. препод; **СЕРГИЕВИЧ Александр Александрович** — к.б.н., ст. препод, altexes@mail.ru.