

ПРОДУКЦИЯ ПРОКАЛЬЦИТОНИНА И НЕКОТОРЫХ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ ПРИ ТЯЖЕЛОЙ ТУБЕРКУЛЁЗНОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ

М.М. Авербах, Л.В. Панова, М.Ф. Губкина, Е.С. Овсянкина
ФГБУ «Центральный НИИ туберкулёза» РАМН, г. Москва

INDICATORS OF PROCALCITONIN AND SOME PROINFLAMMATORY CYTOKINES PRODUCTION IN SEVERE TUBERCULOUS INFECTION IN CHILDREN AND ADOLESCENTS

M.M. Averbakh, L.V. Panova, M.F. Gubkina, E.S. Ovsyankina

Представлены предварительные результаты использования полуколичественного иммуно-хроматографического метода экспресс-диагностики (BRAHMSPCT-Q) уровня прокальцитонина у 35 больных тяжелым туберкулёзом детей и подростков. Положительный результат теста на прокальцитонин (более 0,5 нг/мл) получен у 12, отрицательный (менее 0,5 нг/мл) – у 23 больных. Наличие положительного теста свидетельствует о высокой активности микобактериальной популяции, что подтверждается обнаружением у таких больных микобактерий тремя методами: люминесцентной микроскопии, посева на жидких средах и ПЦР диагностикой (соответственно 83,3%, 100% и 83,3%), в отличие от группы больных с отрицательным показателем теста (соответственно 17,4%, 34,8% и 47,8%). У больных, имеющих положительный тест на прокальцитонин, выявлена достоверно большая продукция ряда провоспалительных цитокинов МИФ, ФНО-α и ИНФ-γ.

Ключевые слова: туберкулёз детей и подростков, прокальцитонин, цитокины.

Введение

Поиск новых лабораторных маркеров инфекционного процесса при туберкулёзе, указывающих на тяжесть заболевания и служащих ориентиром эффективности проводимой терапии, по-прежнему является актуальной проблемой. Любой воспалительный процесс, в том числе и туберкулёз, сопровождается продукцией различных белков неспецифического иммунитета, белков острой фазы воспаления и цитокинов, запускающих реакции неспецифического и специфического иммунитета, определение которых может говорить о наличии воспаления и степени его тяжести. В настоящий момент одним из таких неспецифических маркеров, характеризующих тяжесть генерализованного инфекционного процесса, является прогормон кальцитонина – прокальцитонин, открытый в 1984 г. [10]. В многочисленных работах было показано что, уровень прокальцитонина (ПКТ) был значительно повышен у взрослых больных с различными инфекционными заболеваниями, в том числе сепсисом и септическим шоком, и у детей с бактериальным, но не вирусным менингитом [3]. О. Baylan и

The preliminary results of the use of semi-quantitative immunoassay method (BRAHMSPCT-Q) for rapid diagnosis of procalcitonin level in 35 children and adolescents with severe tuberculosis are presented. Positive result of the procalcitonin test (more than 0,5 ng/ml) has been obtained in 12 patients, and negative one (less than 0,5 ng / ml) – in 23. Positive test result indicates high activity of mycobacterial population, confirmed by the detection of mycobacteria using three methods in such patients: fluorescent microscopy, cultural method on BACTEC and PCR diagnostics (83,3%, 100% and 83,3%, respectively) in contrast to the group of patients with negative test result (17,4%, 34,8% and 47,8%, respectively). In the patients with positive procalcitonin test, reliably greater production of some proinflammatory cytokines, MIF, TNF-α and IFN-γ, has been revealed.

Keywords: tuberculosis in children and adolescents, procalcitonin, cytokines

соавт. (2006) [2] установили, что уровень ПКТ повышен у больных активным туберкулёзом по сравнению со здоровыми лицами, хотя его концентрация была значительно ниже, чем у больных сепсисом и септическим шоком. Помимо клеток щитовидной железы ПКТ синтезируют нейроэндокринные клетки легкого, печени и, в меньшей степени, почек и моноциты крови при действии на них липополисахаридов (ЛПС) [13]. G. Matera и соавт. [11] показали, что молекула ПКТ имеет в своей пространственной структуре две инвагинации, которые способны связывать и инактивировать активность ЛПС из различных источников. В эксперименте и в клинике было показано, что выработку ПКТ стимулируют различные провоспалительные цитокины, такие как интерлейкин (ИЛ)-6, ИЛ-8, фактор некроза опухоли-α (ФНО-α) [6].

Цель работы – определение уровня ПКТ в сыворотке крови больных различными формами туберкулёза детей и подростков в сравнении со спонтанной и антиген стимулированной выработкой в культуре крови ряда провоспалительных цитокинов.

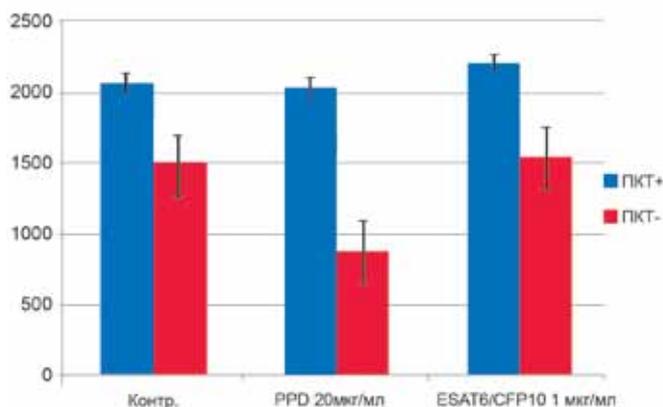
Табл. Результаты микробиологического обследования больных с помощью метода экспресс-диагностики (BRAHMSPCT-Q)

Метод обнаружения МБТ	ПКТ+ (n=12) положительно/отрицательно	ПКТ- (n=23) положительно/отрицательно
Люминесцентная микроскопия	10/2 (83,3%)	4/19 (17,4%)
Метод ВАСТЕС	12/0 (100%)	8/15 (34,8%)
Метод ПЦР	10/2 (83,3%)	11/12 (47,8%)

Материал и методы

В исследование были включены 35 больных туберкулёзом детей и подростков в возрасте от 3 до 17 лет, находившихся в клинике Центрального НИИ туберкулёза РАМН. Из них у четырех диагностирован туберкулёз внутригрудных лимфатических узлов (ТВГЛУ), у одного – очаговый туберкулёз, у 15 – инфильтративный (в фазе распада), у трех – диссеминированный, у двух – казеозная пневмония, у восьми – фиброзно-кавернозный туберкулёз (ФКТ), у одного – диссеминированный туберкулёз в сочетании с ТВГЛУ, внутрибрюшных и периферических лимфатических узлов (шейная группа), туберкулёзом мозга, туберкулёзом печени, у одного туберкулёз трахеи в фазе инфильтрации, очаговый туберкулёз, состояние после пневмонэктомии (по поводу казеозной пневмонии). В исследовании применяли клинические, лабораторные и рентгенологические методы. Микробиологическое исследование на наличие микобактерий туберкулёза проводили методами бактериоскопии, посева на жидких средах (система ВАСТЕС 960) и ПЦР-диагностики. Для определения концентрации прокальцитонина в плазме крови использован полуколичественный иммунохроматографический метод экспресс-диагностики (BRAHMSPCT-Q). При концентрации ПКТ менее 0,5 нг/мл (отсутствие опытной полоски на планшете) результат считали отрицательным. При концентрации 0,5 нг/мл и более опытная полоска окрашивалась в красный цвет, при этом интенсивность окраски прямо пропорциональна concentra-

Рис.1. Спонтанная и антигенстимулированная продукция МИФ у больных ПКТ+ и ПКТ-



ции ПКТ (референсный ряд значений: до 0,5 нг/мл, от 0,5 до 2 нг/мл, от 2 до 10 нг/мл, 10 нг/мл и более). Тест проводили при поступлении больных в клинику, до назначения противотуберкулезной терапии. Из 35 больных у 12 получен положительный ответ (ПКТ+), у 23 отрицательный (ПКТ-). Определение миграции ингибирующего фактора (МИФ), ФНО- α , интерферона- γ (ИНФ- γ) и хемокина CXCL-10 проводили в супернатантах культивированной крови. 1,0 мл цельной крови смешивали с 1,0 мл безсывороточной культуральной среды RPMI 1640 с необходимыми добавками и стимулировали 20 мкг/мл ППД или 1 мкг/мл ESAT-6/CFP-10. Образцы супернатантов собирали через 18-22 часов культивирования. Концентрацию цитокинов определяли методом ELISA, для чего использовали наборы DuoSetHumanMIF и CXCL-10 иммуноферментного анализа R@D (Великобритания). Для определения ФНО-альфа и ИНФ- γ использовали наборы Вектор-БЕСТ (Россия). Результаты обрабатывали статистически с помощью программы MicrosoftExcel.

Результаты и обсуждение

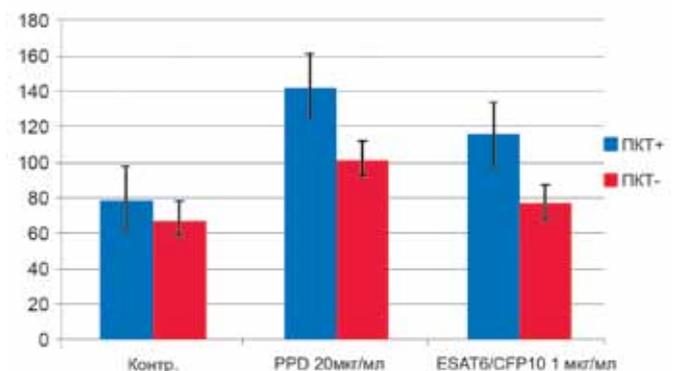
Результаты микробиологического обследования больных, имеющих положительные и отрицательные значения иммунохроматографического метода экспресс-диагностики (BRAHMSPCT-Q) представлены в таблице.

Из 12 больных, имеющих результат ПКТ+, микобактерии обнаружены при люминесцентной микроскопии у 10 (83,3%), при посеве на жидкие среды (ВАСТЕС 960) – у всех 12 (100%) и методом ПЦР – у 10 (83,3%). Из 23 больных, имеющих результат ПКТ-, микобактерии обнаружены при люминесцентной микроскопии у четырех (17,4%), при посеве на жидкие среды у восьми (34,8%) и методом ПЦР – у 11 (47,8%).

При изучении продукции МИФ в культуре крови больных выявлено, что в группе ПКТ+ показатели спонтанной и антигенстимулированной продукции достоверно превышали аналогичные в группе ПКТ- (рис.1).

Интересным является то, что показатели спонтанной и антигенстимулированной продукции внутри групп не различаются

Рис.2. Спонтанная и антигенстимулированная продукция ФНО-альфа у больных ПКТ+ и ПКТ-



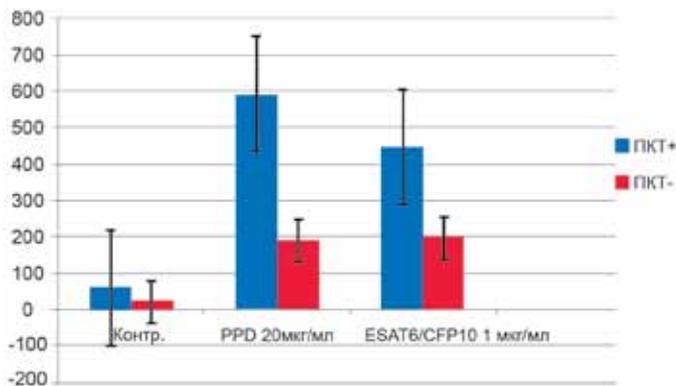


Рис.3. Спонтанная и антигенстимулированная продукция ИНФ-гамма у больных ПКТ+ и ПКТ-

между собой. Аналогичные результаты получены ранее при исследовании продукции МИФ клетками селезенки зараженных мышью СВА и I/St и мононуклеарами периферической крови больных туберкулёзом детей и подростков [1].

При изучении продукции ФНО- α в культуре крови больных выявлено, что в группах ПКТ+ и ПКТ- показатель ППД стимулированной продукции достоверно превышал показатель спонтанной продукции ФНО- α . Этого не наблюдали при стимуляции культур крови ESAT-6/CFP-10. При стимуляции культур крови больных ПКТ+ 20 мкг/мл ППД или 1 мкг/мл ESAT-6/CFP-10 продукция ФНО- α была достоверно выше, чем у больных ПКТ- (рис. 2).

При изучении продукции ИНФ- γ в культуре крови больных выявлено, что в группах ПКТ+ и ПКТ- показатель ППД и ESAT-6/CFP-10 стимулированной продукции достоверно превышал показатели спонтанной продукции ИНФ- γ . Антигенстимулированная продукция ИНФ- γ была достоверно выше у больных ПКТ+ по сравнению с больными ПКТ- (рис. 3).

При изучении продукции CXCL-10 в культуре крови больных выявлено, что в группах ПКТ+ и ПКТ- ESAT-6/CFP-10 стимулированная выработка этого хемокина достоверно превышала показатели спонтанной продукции. Сравнение данных спонтанной, стимулированной антигенами ППД и ESAT-6/CFP-10 выработки этого хемокина между исследуемыми группами различий не выявило (рис. 4).

Полученные результаты изучения выраженности секреции ПКТ экспресс-методом у больных различными формами туберкулёза детей и подростков указывают, что положительную реакцию отмечают в тех наблюдениях, когда активность микобактерий туберкулёза в организме значительно выражена. Об этом свидетельствуют положительные результаты микробиологических тестов. G. Matera и соавт. (2012) предполагают, что ПКТ связывает не только ЛПС грамотрицательных микроорганизмов, но и сходные структуры липополисахаридной природы у бактерий других видов, в том числе и микобактерий туберкулёза [11].

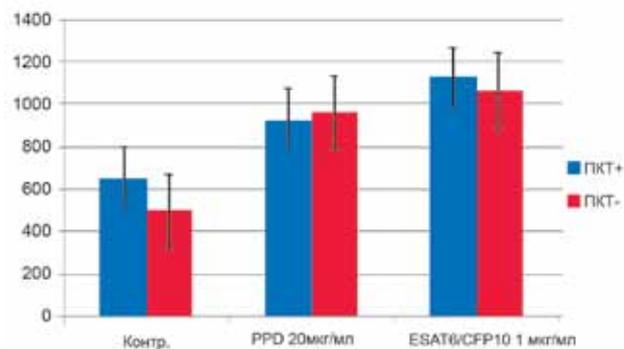


Рис. 4. Спонтанная и антигенстимулированная продукция CXCL-10 у больных ПКТ+ и ПКТ-

Степень выраженности специфического воспалительного процесса у ПКТ+ больных характеризуется также достоверно большим выбросом у них ряда провоспалительных цитокинов (МИФ, ФНО- α и ИНФ- γ). МИФ рассматривается в качестве важной части стрессорной реакции организма и его содержание в сыворотке крови зависит в основном от выработки гипоталамо-гипофиз-надпочечниковой системой под влиянием гормона гипофиза кортиколиберин [14]. МИФ существует также в клетках макрофагальной, лимфоцитарной природы в преформированном виде и поэтому быстро выделяется в ответ на воздействие эндо- и экзотоксинов, ФНО- α и ИНФ- γ в местах воспаления [4]. Кроме того, отмечена вариабельность уровня синтеза МИФ в зависимости от стадии заболевания и высокая концентрация МИФ в сыворотке коррелировала со степенью тяжести туберкулёзного процесса [8]. Высокая продукция ФНО- α и ИНФ- γ в активную фазу туберкулёзного процесса отмечена многими исследователями, однако обнаружена и вариабельность этих показателей, в зависимости от степени выраженности бактериовыделения и, в случае ИНФ- γ , локализации процесса в легких или при внелегочных формах [5, 9].

Хемокин CXCL10 или IP10 секретируется при инфекциях лейкоцитами, нейтрофилами, эозинофилами, моноцитами, эпителиальными и стромальными клетками и через CXCR3 рецептор, экспрессированный преимущественно на активированных Т- и В-лимфоцитах, NK- и дендритных клетках, индуцирует их хемотаксис и апоптоз в очагах воспаления [12]. В настоящее время этот хемокин интенсивно исследуют у больных с активным и латентным туберкулёзом в комбинации с ИНФ- γ , ИЛ-2 и другими хемокинами (MCP-1, MCP-2). Результаты неоднозначны, но отмечено, что его спонтанная продукция (наличие в сыворотке или культуральных супернатантах) несколько выше у больных с латентным, чем активным туберкулёзом, а стимуляция культур крови и клеток не приводит к увеличению выработки CXCL10 (аналогичные данные получены как у детей [16], так и у взрослых [15]). Отсутствие различий

в спонтанной и антигенстимулированной продукции CXCL10 подтверждено в настоящем исследовании.

Заключение

Результаты положительного теста на прокальцитонин, полученные с помощью полуколичественного иммунохромато-

графического метода экспресс-диагностики (BRAHMSPCT-Q) у больных туберкулёзом детей и подростков свидетельствуют о высокой активности микобактериальной популяции, что подтверждается более высокими показателями таких провоспалительных цитокинов как МИФ, ФНО- α и ИНФ- γ .

Литература

1. Авербах М.М. мл., Кондратьева Е.В., Горелова Л.А., Губкина М.Ф., Панова Л.В. Изучение выработки МИФ на экспериментальной модели и при различных формах туберкулёза у детей и подростков // Юбилейный сб. статей 50 лет отделу иммунологии ФГБУ «ЦНИИТ» РАМН. – М., 2013. – С. 21-30.
2. Baylan O., Balkan A., Inal A. et al. The predictive value of procalcitonin levels in adult patients with active pulmonary tuberculosis // *Jpn. J. Infect. Dis.* – 2006. – Vol. 59. – P. 164-167.
3. Bohuon C. A Brief history of procalcitonin // *Intens. Care Med.* – 2000. – Vol. 26. – S. 146-147.
4. Calandra T. Macrophage migration inhibition factor and host innate immune response to microbes // *Scan. J. Infect. Dis.* – 2003. – Vol. 35. – P. 573-576.
5. Cooper A.M. Cell-mediated immune responses in tuberculosis // *Annu. Rev. Immunol.* – 2009. – Vol. 27. – P. 393-422.
6. Dandona P., Nix D., Wilson M.F. et al. Procalcitonin increase after endotoxin injection in normal subjects // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1994. – Vol. 79. – P. 1605-1608.
7. Ghillani P., Motte P., Troalen F. et al. Identification and measurement of calcitonin precursors in serum of patient with malignant diseases // *Cancer Res.* – 1989. – Vol. 4. – P. 6845-6851.
8. Kibiki G.S., van der Ven A.J., Geurts-Moespot A. et al. Serum and BAL macrophage migration inhibitory factor levels in HIV infected Tanzanians with pulmonary tuberculosis or other lung diseases // *Clin. Immunol.* – 2007. – Vol. 123. – P. 60-65.
9. Kunnath-Velayudhan S., Gennaro M. Immunodiagnosis of tuberculosis: a dynamic view of biomarker discovery // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2011. – Vol. 24. – P. 792-805.
10. LeMoullec J.M., Jullienne A., Chenais J. et al. The complete sequence of human preprocalcitonin // *FEBS.* – 1984. – Vol. 167. – P. 93-97.
11. Matera G., Quirino A., Giancotti A. et al. Procalcitonin neutralizes bacterial LPS and reduces LPS-induced cytokine release in human peripheral blood mononuclear cells // *BMC Microbiol.* – 2012. – V. 12. – P. 68. doi: 10.1186/1471-2180-12-68.
12. Mingli L., Shanchun G., Stiles J.K. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications // *Cytokine growth factor Rev.* – 2011. – Vol. 22. – P. 121-130.
13. Russwurm S., Stonans I., Stonane E. et al. Procalcitonin and CGRP-1 mrna expression in various human tissues // *Shock.* – 2001. – Vol. 16. – P. 109-12.
14. Nishino T., Bernhagen J., Calandra T. et al. Localization of macrophage-migration inhibitory factor (MIF) to secretory granules within the corticotropic and thyrotropic cells // *Mol. Med.* – 1995. – Vol. 1. – P.781-788.
15. Sen Wang S., Diao N., Lu C. et al. Evaluation of the diagnostic potential of IP-10 and IL-2 as biomarkers for the diagnosis of active and latent tuberculosis in a BCG-vaccinated population // *PLoSOne.* – 2012. – Vol. 7 (12): e51338.
16. Whittaker E., Gordon A., Kampmann B. Is IP-10 a better biomarker for active and latent tuberculosis in children than IFN γ ? // *PLoS ONE.* – 2008. – Vol 3 12): e3901.

Сведения об авторах

Авербах Михаил Михайлович – главный научный сотрудник ФГБУ «Центральный НИИ туберкулёза» РАМН, г. Москва

Адрес: 119311, г. Москва, ул. Строителей, д. 6, корп.1, кв. 12.

Телефон (499) 785-90-72; факс (499) 785-91-08

e-mail: amm50@mail.ru

Панова Людмила Владимировна – старший научный сотрудник ФГБУ «Центральный НИИ туберкулёза» РАМН, г. Москва

Адрес: 141078, Московская область, г. Королев, пр. Королева, д.3 а, кв.30.

Телефон (499) 785-90-05; факс (499) 785-91-08

e-mail: detstvocniit@mail.ru

Губкина Марина Федоровна – ведущий научный сотрудник детско-подросткового отдела ФГБУ «Центральный НИИ туберкулёза» РАМН, г. Москва

Адрес: г. Москва, Яузская аллея, д. 2.

Телефон (499) 785-90-27; факс (499) 785-91-08

e-mail: detstvocniit@mail.ru

Овсянкина Елена Сергеевна – заведующая детско-подростковым отделом ФГБУ «Центральный НИИ туберкулёза» РАМН, г. Москва, доктор медицинских наук, профессор

Адрес: г. Москва, Яузская аллея, д. 2.

Телефон (499) 785-90-05; факс (499) 785-91-08

e-mail: detstvocniit@mail.ru