

Н. В. Москалева¹, С. В. Жаворонок², О. Л. Тумаш³

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ sFAS/APO-1(CD-95)-АНТИГЕНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»¹,
УО «Белорусский государственный медицинский университет»²,
УО «Гомельский государственный медицинский университет»³

Мы исследовали сыворотки крови 123 ВИЧ-инфицированных пациентов с помощью разработанной авторами иммуноферментной тест-системы для определения sFas/Apo-1 (CD95)-антигена.

Ключевые слова: апоптоз, растворимый антиген, sFas/Apo-1 (CD-95), ВИЧ-инфекция, иммуноферментный анализ

DIAGNOSTIC VALUE OF ENZYME IMMUNOASSAY TEST SFAS / APO-1 (CD-95) ANTIGEN IN THE SERUM IN PRESENCE OF HIV INFECTION

We studied serum of 123 HIV-infected patients with ELISA test-system for sFas/Apo-1 (CD95)-antigen determining, which was developed by authors.

Key words: Apoptosis, soluble antigen, sFas/Apo-1 (CD95), HIV-infection, enzyme linked immunosorbent assay

У ВИЧ-инфицированных людей большинство субпопуляций лимфоцитов подвергаются ускоренному Fas-опосредованному апоптозу, что может играть важную роль в патогенезе ВИЧ-инфекции [1]. Fas/Apo-1(CD95) – это основной рецептор, запускающий программу самоуничтожения клетки. Существует его растворимая форма (sFas/Apo-1 (CD-95)), которая является продуктом альтернативного сплайсинга полноразмерной мРНК. Это растворимый белок конкурирует с мембранно-связанным рецептором Fas/Apo-1 (CD95) в связывании лиганда (FasL) и может подавлять Fas-опосредованный апоптоз. Значение sFas/Apo-1 (CD-95)-антигена при реализации иммунного ответа на вирусные инфекции изучено недостаточно. Имеющиеся данные о роли sFas/Apo-1(CD-95)-антигена в патогенезе ВИЧ-инфекции противоречивы и требуют более глубокого изучения с перспективой его практического применения в качестве дополнительного диагностического и прогностического критерия при оценке течения заболевания [2,3,4;5,6,7].

Цель исследования: оценить диагностическую значимость исследования sFas/Apo-1(CD-95)-антигена в сыворотке крови при ВИЧ-инфекции методом иммуноферментного анализа (ИФА) на основе моноклональных антител (МКА) ИКО-160.

Материал и методы

Исследовали сыворотки крови 123 ВИЧ-инфицированных пациентов (опытная группа). Из них 101 (82%) человек составили взрослые (средний возраст $30,5 \pm 0,7$) и 22 (24%) человека – дети (средний возраст $7,3 \pm 0,9$). Среди взрослых 20 человек (20%) составили мужчины (средний возраст $37,1 \pm 2,3$) и 81 человек (80%) – женщины (средний возраст $28,9 \pm 0,6$), из них 40 (49%) женщин (средний возраст $27,4 \pm 0,6$) на момент обследования были беременные. Контрольная группу составили 66 практически здоровых доноров крови (45(68%) мужчин и 21(32%) женщина) в возрасте 21-56 лет (средний возраст $36,9 \pm 1,3$).

Исследование проводили с помощью разработанной авторами твердофазной ИФА тест-системы для определения sFas/Apo-1 (CD95)-антигена в сыворотке крови на основе МКА ИКО-160. Аналитическая надежность метода: диагностическая чувствительность – 95,6%, диагностическая специфичность – 90%. Вначале стрипы сорбировали МКА к Fas/Apo-1 (CD95)-антигену, внося по 100 мкл в каждую лунку с последующей инкубацией в течение 16 часов при $t 37^\circ\text{C}$ во влажной камере. После пятикратной промывки фосфатно-солевым буферным раствором с добавлением твин-20, pH 7,0 (ФСР-Т) во все лунки вносили по 200 мкл 1% бычьего сывороточного альбумина и вновь инкубировали во влажной камере при 37°C в течение двух часов. После проведения пятикратного промывания вносили в лунки контрольные и анализируемые образцы сывороток крови (100 мкл);

для контроля конъюгата в 2 лунки вносили по 100 мкл раствора ФСР-Т. Проводили инкубацию во влажной камере в течение 1 часа при 37°C , заклеив стрипы пленкой. Затем пробы промывали 5 раз и вносили по 100 мкл свежеприготовленного раствора конъюгата пероксидазы хрена ($RZ=3,6$) с МКА к Fas/Apo-1 (CD95)-антигену в рабочем разведении в буфере для отмывки. Инкубировали во влажной камере при 37°C в течение 1 часа с последующим промыванием (5раз). Затем во все лунки вносили по 100 мкл свежеприготовленного рабочего раствора тетраметилбензидина (ТМБ) и инкубировали в темноте 15 мин. при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением во все лунки по 100 мкл стоп-реагента. Затем немедленно производили учет результатов реакции, измерив величину оптической плотности (ОП) в лунках на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр в диапазоне 620-650 нм. Результаты исследования выражали в единицах оптической плотности (е.о.п.). Рассчитывали среднее арифметическое значение ОП в лунках с отрицательным контрольным образцом (ОПср.К-) и с положительным контрольным образцом (ОПср.К+). Результаты анализа учитывали при соблюдении следующего условия: отношение $\text{ОПср.К+} / \text{ОПср.К-} \geq 5$. Рассчитывали критическое значение ОП (ОПкрит.) по формуле: $\text{ОП крит.} = \text{ОПср.К+} + 0,158$. Если в результате анализа $\text{ОП обр.} \geq \text{ОПкрит.}$, то уровень sFas/Apo-1 (CD95)-антигена считали повышенным. Если в результате анализа $\text{ОП обр.} < \text{ОПкрит.}$, то уровень sFas/Apo-1 (CD-95)-антигена считали низким. Где ОПобр. – ОП в лунке с исследуемым образцом.

Результаты и обсуждение

У ВИЧ-инфицированных пациентов, в том числе беременных женщин и детей, средний уровень оптической плотности (ОП) (Ме 0,233 (0,119-0,804)е.о.п. против Ме 0,084 (0,069-0,144)е.о.п. $U=1626,0$, $p<0,001$) и частота выявления (52,8%, $n=123$ против 9,1%, $n=66$, $c^2=33,2$, $p<0,001$) повышенного уровня ОП sFas/Apo-1(CD-95) в сыворотке крови значимо выше, чем у практически здоровых доноров. Средние уровни (Ме 0,228 (0,137-0,564)е.о.п. против Ме 0,204 (0,126-0,834)е.о.п., $U=628$, $p=0,658$) и частота (50,8%, $n=61$ против 54,5%, $n=22$, $p>0,05$) выявления повышенных уровней ОП sFas/Apo-1(CD-95) в сыворотке крови значимо не различаются в группах взрослых и детей. Средние уровни (Ме 0,337 (0,174-1,038) о.е.п. против Ме 0,187 (0,135-0,343) о.е.п., $U=624$, $p=0,052$) и частота (58,8%, $n=34$ против 46,9%, $n=49$, $2=0,71$, $p=0,399$) выявления повышенных уровней ОП sFas/Apo-1(CD-95)-антигена в сыворотке крови значимо не различаются в группах мужчин и женщин. У пациентов на более поздних стадиях ВИЧ-инфекции (А3, В3, С1, С2, С3) (СПИД) (в соответствии с делением на клинические категории по международной класси-

■ Оригинальные научные публикации

фикации СДС 1993 г. для взрослых и 1994 г. для детей) средние уровни ОП, как у детей ($H(4, N=22)=10,93, p=0,003$), так и у взрослых ($H(7, N=61)=22,10, p=0,002$), и частота выявления повышенных уровней ОП sFas/Apo-1(CD-95) в сыворотке крови, как у детей, так и у взрослых ($c^2=7,52, p=0,006$), значимо выше, чем у пациентов на ранних стадиях заболевания (A1, A2, B1, B2). Повышенные уровни ОП sFas/Apo-1(CD-95)-антигена в сыворотке крови определяются только у ВИЧ-инфицированных пациентов с количеством CD4+ Т-лимфоцитов <350 клеток/мкл (уровень CD4 клеток рекомендованный ВОЗ для старта антиретровирусной терапии) (AUC ROC (95% ДИ) = 81,1 (69,1-90, 0)%, чувствительность (95%) = 68,2 (52,4-81,4)%, специфичность (95%) = 94,1 (71,2-99,0)%) и прямо умеренно коррелируют с клинической стадией ВИЧ-инфекции ($R=0,38, p=0,005$).

Таким образом, разработанная авторами твердофазная иммуноферментная тест-система позволяет с диагностической чувствительностью 68,2 (52,4-81,4)%, и диагностической специфичностью 94,1 % (71,2-99,0)%, AUC ROC (95% ДИ) = 81,1 (69,1-90,0) выявлять sFas/Apo-1(CD-95)-антиген в сыворотке крови ВИЧ-инфицированных пациентов. У ВИЧ-инфицирован-

ных пациентов определяются более высокие уровни ОП sFas/Apo-1(CD-95)-антигена в сыворотке крови в сравнении с практически здоровыми донорами. Определение данного показателя может быть использовано в комплексе с общепринятым критерием оценки прогрессирования ВИЧ-инфекции (количество CD-4 лимфоцитов в крови), для выделения группы пациентов, нуждающихся в начале антиретровирусной терапии.

Литература

1. Naoki Hosaka Membrane and Soluble Forms of Fas(CD95) and Fas Ligand in Peripheral Blood Mononuclear Cells and in Plasma from Human Immunodeficiency Virus – Infected Persons / Naoki Hosaka et al. // The Journal of Infectious Diseases 1998. - №178. – P.1030 – 9.
2. Новиков, В. В. Растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы / Новиков В. В., Барышников А. Ю., Караулов А. В. // Иммунология. - 2007. - №4. - С. 249-253.
3. Gougeon, M.-L. New insights on the role of apoptosis and autophagy in HIV pathogenesis Apoptosis / M.-L. Gougeon, A. M. Piacentini // Springer Science+Business Media. – 2009. - № 14. – С. 501 – 508.
4. Proussakova, O. V. Oligomerization of soluble Fas antigen induces its cytotoxicity / Proussakova O. V., Rabaya N. A., Moshnikova A. B. // J. Biol. Chem. — 2003. — Vol. 278. — P. 36236 — 36241.
5. Жукова, О. Б. Вирусная персистенция: иммунологические и молекулярно-генетические аспекты патогенеза / Жукова О. Б., Рязанцева Н. В., Новицкий В. В. // Бюллетень сибирской медицины. - 2003. - № 4. – С.112-120.
6. Барышников, А. Ю. Иммунологические проблемы апоптоза / Барышников А. Ю., Шишкин Ю. В. – М.: Эдиториал УРСС. - 2002. – 320с.
7. Бойчук, С. В. FAS-рецептор и его роль при atopических заболеваниях / С. В. Бойчук, И. Г. Мустафин // Иммунология 2001. - №3. – С.24-28.