

ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ ТЕСТ НА АЛЬФА2-МАКРОГЛОБУЛИН В ОЦЕНКЕ ИММУННОГО СТАТУСА ЧЕЛОВЕКА

Кривенцев Ю.А.¹, Носков А.И.¹, Осыко С.В.², Кривенцева Л.А.¹, Коханов А.В.¹,
Кривенцева М.Ю.¹

¹ ГБОУ ВРО «Астраханский государственный медицинский университет Минздрава России», Астрахань, e-mail: agma@astranet.ru;

² Филиал № 3, ФГКУ «413 Военный госпиталь» Минобороны России, Астрахань, e-mail: astravg@mail.ru

Разработан оригинальный способ выделения и очистки альфа-2-макроглобулина человека, состоящий из последовательных этапов высаливания исходного материала сульфатом аммония 50-процентной насыщенности, центрифугирования при 6000 об/мин, ионообменной хроматографии на DEAE-сефадексе А-50 и гель-проникающей хроматографии на Toyopearl-65. На следующем этапе исследования разработана специфическая иммунохимическая тест-система для определения альфа-2-макроглобулина методом ракетного электрофореза в агаровом геле по Laurell с порогом чувствительности $3,95 \pm 0,19$ мг/л. Разработанную тест-систему применяли для определения уровней альфа-2-макроглобулина в сыворотках крови пациентов с хирургической, терапевтической и инфекционной патологией, сопровождающейся выраженными изменениями иммунного статуса. Иммунохимический анализ клинического материала показал достоверное повышение средней концентрации альфа-2-макроглобулина при заболеваниях, сопровождающихся угнетением иммунного статуса, и достоверное снижение этого показателя при заболеваниях, сопровождающихся патологической активацией иммунитета. Полученные данные свидетельствуют о высоком практическом значении альфа-2-макроглобулина как клинико-диагностического маркера изменения иммунного статуса.

Ключевые слова: альфа-2-макроглобулин, иммунитет, иммуносупрессия, иммуномодуляторы, туберкулез, лепра, ожоговая болезнь, системные болезни.

IMMUNOCHEMICAL TEST ON ALPHA 2-MACROGLOBULIN FOR EVALUATION OF HUMAN IMMUNE STATUS

Kriventsev Y.A.¹, Noskov A.I.¹, Osyko S.V.², Kriventseva L.A.¹, Kokhanov A.V.¹,
Kriventseva M.Y.¹

¹Astrakhan State Medical University, Astrakhan, e-mail: agma@astranet.ru;

² Branch FSOI «413 Military hospital», Astrakhan, e-mail: astravg@mail.ru

An original method for the isolation and purification of humans alpha-2-macroglobulin, consisting of successive stages starting material salting out with ammonium sulfate to 50 percent saturation, centrifugation at 6000 rev / min, ion-exchange chromatography on DEAE-Sephadex A-50 and gel filtration on Toyopearl-65 was designed. On the next stage of the study was obtained specific immunochemical test system to determine the level of alpha-2-macroglobulin by rocket electrophoresis on agarose gel by Laurell with the sensitivity threshold 3.95 ± 0.19 mg / l. A test system was used to determine serum levels of alpha-2-macroglobulin in patients with surgical, therapeutic and infectious diseases accompanied by pronounced changes in immune status. Immunochemical analysis of clinical samples showed a significant increase in the average concentration of alpha-2-macroglobulin in diseases involving suppression of immunity and significant decrease of this indicator in diseases with abnormal activation of the immune system. The received data indicate a high practical value of the alpha-2-macroglobulin, as the clinical and diagnostic marker of immune status changes.

Keywords: alpha-2-macroglobulin, immunity, immunosuppression, immune modulators, tuberculosis, leprosy, burn disease, systemic disease.

Одним из перспективных маркеров изменения иммунного статуса, на наш взгляд, является альфа2-макроглобулин (МГ). Это гликопротеид, содержащий 9% углеводов, с молекулярной массой 720-820 кДа, рI - 5,4. Данный белок является одним из ключевых ингибиторов протеиназ, участвующим в регуляции активности многих протеолитических энзимов человеческого организма. Связывание протеиназ осуществляется определенным

фрагментом субъединицы МГ, не затрагивая каталитически активного центра фермента [1; 3; 4; 9].

Примерно на десятой неделе внутриутробного развития уровень МГ в сыворотке крови достигает 15% от уровня взрослого и постепенно повышается до нормальных (для взрослого) значений. Максимальный уровень отмечается к 1-3 годам (примерно 4,5 г/л), затем постепенно снижается до стабилизации на уровне, характерном для взрослых к 25 годам. Его концентрация у женщин примерно на 20% выше, чем у мужчин. Средняя концентрация МГ в плазме крови взрослых людей составляет 2,6-3,3 г/л [1; 3; 4].

Согласно современным данным, альфа2-макроглобулин имеет существенное клинко-диагностическое значение. Он является выраженным маркером «острой фазы», концентрация которого тонко реагирует на большинство острых воспалительных заболеваний. Достоверное повышение уровня сывороточного МГ регистрируется при нефротической патологии, а также в случаях раннего отторжения трансплантата. Высокие концентрации белка обнаружены у больных сахарным диабетом, особенно при нарушении функции почек. Снижение уровня МГ регистрируется при вирусном гепатите, остром панкреатите, ревматическом остеоартрозе, на ранних стадиях ожоговой болезни [2; 4; 5; 11].

Ранее нами было отмечено, что средняя концентрация МГ в плазме крови экспоненциально возрастает в течение беременности, достигая максимума в конце ее, что свидетельствует о непосредственном участии в процессе формирования иммунологической толерантности беременности [6; 7].

Кроме того, доказано, что МГ обладает выраженной иммуносупрессивной активностью по отношению к различным звеньям иммунной системы человека. Наиболее сильно выражено иммуносупрессивное действие белка по отношению к лимфоцитам в течение беременности, особенно в первом триместре. Этот белок индуцирует способность макрофагов и нейтрофилов мигрировать в участки воспаления [4; 5; 8-10].

В соответствии с изложенными фактами логично предположить, что МГ является активным компонентом процессов гуморального иммунитета и, следовательно, может выступать в качестве маркера изменений и нарушений иммунного статуса человеческого организма.

Учитывая, что заболевания, сопровождающиеся нарушением иммунитета, составляют обширный пласт современной нозологии, выявление патогенетических звеньев иммунного дисбаланса и разработка новых способов оптимизации качества диагностики подобных патологических состояний путем апробации и внедрения иммунохимического теста на МГ, безусловно, являются актуальной задачей современной медицины.

Цель исследования: количественный иммунохимический анализ сывороточной концентрации МГ при ряде патологических состояний, сопровождающихся изменением иммунного фона, и выявление корреляции количественных показателей с течением патологического процесса.

Материалы и методы исследования

Проведен количественный иммунохимический анализ уровня МГ в пробах сыворотки крови 156 пациентов больных с патологической активацией и супрессией иммунитета, из них: больные туберкулезом – 36 человек, лепрой – 24, ожоговой болезнью – 38, с аутотрансплантацией после ожогов – 11, системной красной волчанкой (СКВ) – 5, здоровые доноры (контрольная группа) - 42.

При разработке способа выделения и очистки МГ применяли методы высаливания глобулинов сульфатом аммония 40%-ной насыщенности, центрифугирование при 6000 об/мин, ионообменную хроматографию на DEAE-сефадексе А-50 в ступенчатом восходящем градиенте ионной силы, рабочий буфер 0,01 М трис-НСl, рН 7,2, гель-проникающую хроматографию на Тооpearl-65, рабочий буфер 0,15 М фосфатный, рН 7,4.

Количественный анализ альфа-2-макроглобулина проводили методом ракетного электрофореза в агаровом геле в варианте Laurell С.В. и Merrill D. с использованием моноспецифической самостоятельно полученной тест-системы на этот белок. Определение концентраций МГ в биоматериале проводилось из расчета порога чувствительности разработанных тест-систем.

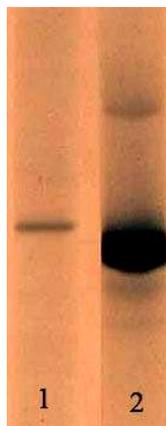
Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием лицензионного пакета прикладных программ статистического анализа Statistica 6.0 (StatSoft. Inc.), с вычислением средних величин (М), средней ошибки средней арифметической (m), критерия Стьюдента (t), значимости различий (p). Для оценки межгрупповой зависимости проводили линейный корреляционный анализ Пирсона (коэффициент корреляции - r). Для оценки статистической значимости показателей концентрации МГ у больных с СКВ использовали способы статистического анализа для малых выборок.

Результаты исследований

На основе полученных ранее данных о физико-химических свойствах МГ [6; 7] разработан оригинальный алгоритм выделения и очистки этого белка. Исходным биоматериалом для этого служила сыворотка крови беременных женщин поздних сроков (36-40 недель гестации), которую получали в МУЗ «Клинический родильный дом» г. Астрахани. Способ очистки МГ включал последовательные этапы: высаливание исходного материала сульфатом аммония 40%-ной насыщенности с последующим центрифугированием (6000 g), ионообменную хроматографию на DEAE-сефадексе А-50

(рабочий буфер 0,01 М трис-НСl, рН 7,2) в ступенчатом восходящем градиенте ионной силы, гель-фильтрацию на Тоуореагl-65 (рабочий буфер 0,15 М фосфатный, рН 7,4).

Контроль чистоты полученных препаратов осуществляли путем аналитического электрофореза в полиакриламидном геле (рис. 1).



*Рис. 1. Анализ чистоты полученного препарата МГ методом электрофореза в ПААГ.
1 - очищенный препарат МГ, 2 – полуочищенный препарат*

Полученные вышеописанным способом очищенные препараты МГ использовали для получения антисывороток путем иммунизации кроликов породы шиншилла дробными дозами чистого антигена с адьювантом Фрейнда по следующей схеме: инъекция включала смесь антигенного материала с полным адьювантом Фрейнда в соотношении 1:2. Смесь вводилась подкожно в боковую поверхность туловища животного в 8 точек. Инъекции проводились четырежды с недельным интервалом. Забор крови осуществлялся из краевой вены уха животного на 6-10-й день после последнего введения.

Если полученные антисыворотки не являлись моновалентными, то для избавления от балластных антител проводили истощение антисыворотки методом аффинной сорбции с фиксированными антигенами (лиофилизированная плазма донора). Данная методика представляет собой собственную модификацию метода связывания белков с полиакриламидным гелем (Bio Gel P-200) при использовании глутарового альдегида.

Абсолютную чувствительность полученных тест-систем определяли как частное концентрации белка в очищенном препарате, определенного биуретовым методом, и максимального рабочего разведения тест-антигена.

В результате проведенной работы разработаны специфические иммунохимические тест-системы на МГ, в которых тест-антигеном является сыворотка крови беременных женщин поздних сроков (35-40 нед) в рабочем разведении: 1/8, с порогом чувствительности $3,95 \pm 0,19$ мг/л.

Полученные тест-системы использовали, в частности, для определения уровня МГ методом ракетного электрофореза в агаровом геле в варианте Laurell С.В. и Merrill D. в клиническом материале.

Сравнительный анализ сывороточных концентраций МГ показал значительный разброс средних показателей в различных исследуемых нозологических группах (таблица).

Уровни сывороточного МГ в исследуемых группах

<i>Исследуемые группы</i>	<i>Количество проб</i>	<i>Средняя концентрация МГ (M±m) (мг/л)</i>
Системная красная волчанка	5	80,0±0
Туберкулез	36	854,6± 92,4
Лепра	24	451,2±55,9
Ожоговая болезнь	38	212,1±27,8
Аутотрансплантация после ожогов	11	121,7±23,0
Контрольная группа	42	292,3±35,3

Анализ результатов по группе больных с туберкулезом позволил выявить достоверное превышение средней концентрации МГ - 854,6 мг/л, по сравнению с группой контроля - 290 мг/л, ($t=6,2$; $p<0,01$). Распределение средних величин МГ внутри обследуемой группы больных туберкулезом тоже имело определенную закономерность: при диссеминированных формах туберкулеза и туберкулезе, осложненном плевритом, среднее содержание сывороточного МГ составляло 342,9 мг/л ($t=3,9$; $p<0,05$), при фиброзно-кавернозной форме - 946,7 мг/л ($t=6,8$; $p<0,005$).

Средние показатели МГ у больных лепрой оказались достоверно повышены – 451,2 мг/л ($t=5,8$; $p<0,01$). Хотя при данной патологии повышение исследуемого белка не так значительно, как при туберкулезе.

У пациентов с СКВ средняя концентрация МГ в сыворотке крови оказалась равной 80 мг/л, что значительно ниже средних величин содержания этого белка в контрольной группе ($t=5,1$; $p<0,01$).

Контингент обследуемых ожоговых больных был представлен только пациентами с ожогами III-IV степеней и значительной площадью поражения без сопутствующей инфекционной и вегетативной патологии. Анализ полученных результатов показал значительное снижение (до 20 мг/л) уровня сывороточного МГ в начальные стадии ожоговой болезни, нормализацию концентраций этого белка на 4-5-й день процесса и дальнейшее повышение его средних значений до 600-700 мг/л к 10-15 дням ожоговой болезни ($t=4,4$;

$p < 0,05$) (рис. 2). Показана высокая прямая корреляционная зависимость между течением ожоговой болезни и ростом концентрации сывороточного МГ ($r = 0,87$).

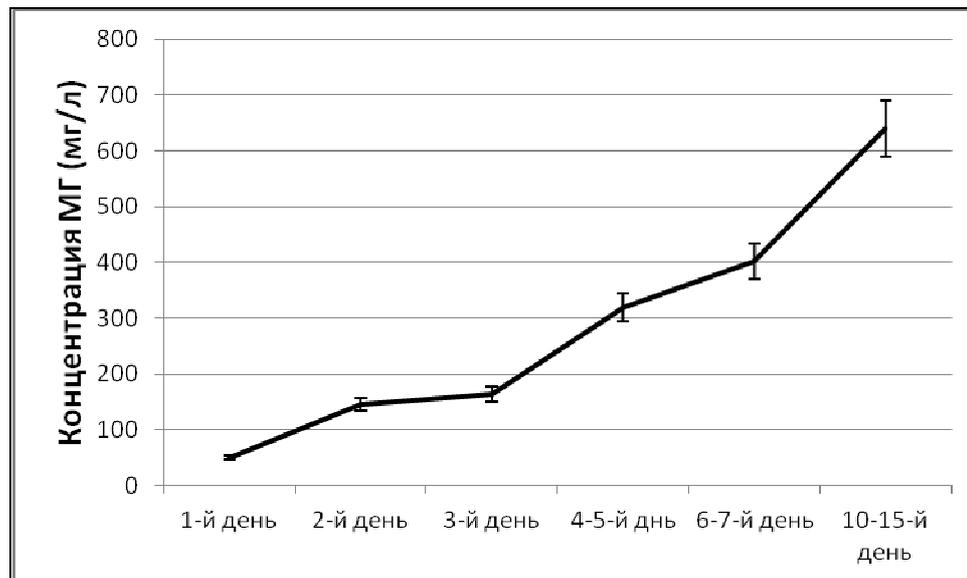


Рис. 2. Динамика изменения концентраций МГ в сыворотке крови при ожоговой болезни

Исследовались также пробы пациентов с аутотрансплантацией кожи на фоне ожогов тяжелой степени (III-IV). Средняя концентрация сывороточного МГ у них составляла – 121,7 мг/л, что значительно ниже нормы ($t=4,8$; $p < 0,05$).

Полученные данные свидетельствуют о биологической роли альфа-2-макроглобулина как активного фактора иммуносупрессии, уровень сывороточной концентрации которого имеет обратную зависимость от степени активности иммунного статуса человеческого организма (что не противоречит имеющимся в литературе данным), и показывают необходимость внедрения иммунохимического теста на МГ в клиническую лабораторную практику для оптимизации диагностики и повышения контроля качества лечения заболеваний, сопровождающихся изменением иммунитета.

Выводы

1. Полученные данные свидетельствуют о высоком значении МГ как негативного маркера иммунного статуса организма, концентрация которого повышается при заболеваниях, ассоциированных с иммуносупрессией (лепра, туберкулез, разгар ожоговой болезни), и снижается при патологической активации иммунитета (СКВ, ранние стадии ожоговой болезни).

2. Внедрение иммунохимического теста на альфа-2-макроглобулин в клиническую практику позволит оптимизировать диагностику и повысить контроль качества лечения ряда

заболеваний, сопровождающихся изменением иммунного статуса.

Список литературы

1. Бойко О.В. Биохимические и иммунохимические маркеры в диагностике патологических состояний / О.В. Бойко, А.Х. Ахминеева, Н.И. Гудинская // *Фундаментальные исследования*. — 2013. — № 9. — С. 327-329.
2. Бойко О.В. Возрастные изменения иммунологических, морфологических и биохимических показателей репродуктивной системы мужчин / О.В. Бойко, А.Х. Ахминеева, Н.И. Гудинская, В.И. Бойко, Д.М. Козак // *Успехи геронтологии*. — 2014. — Т. 27, № 1. — С. 50-53.
3. Буравкова Л.Б. Иммуномодулирующие свойства мезенхимальных стромальных клеток // *Аллергология и иммунология*. — 2015. — Т. 16, № 4. — С. 344-347.
4. Веремеенко К.Н. О наличии двух видов ингибиторов трипсина в сыворотке крови / К.Н. Веремеенко, А.И. Кизим // *Биохимия*. — 2005. — Т. 29, вып. 1. — С. 132-137.
5. Зубаиров Д.М. Биохимия свертывания крови. — М. : Медицина, 2008. — С. 176.
6. Кривенцев Ю.А. Изучение уровня альфа2-макроглобулина человека у больных с ожоговой болезнью и аутоиммунными заболеваниями / Ю.А. Кривенцев, Д.М. Никулина, А.В. Самсонов // *Комбустиология*. — 2002. — № 12-13. — С. 18-20.
7. Топчиев М.А. Клинико-диагностическое значение связанного с беременностью альфа2-гликопротеина при различных формах острого аппендицита / М.А. Топчиев, Ф.В. Орлов, Э.А. Кчибеков, Д.С. Паршин, Ю.А. Кривенцев // *Астраханский медицинский журнал*. — 2011. — Т. 6, № 1. — С. 153-155.
8. Проходная В.А. Особенности системных иммунных реакций у беременных женщин с хроническим пародонтитом / В.А. Проходная, Т.В. Гайворонская, И.М. Быков, Е.Х. Чибичян, А.С. Ломова // *Аллергология и иммунология*. — 2015. — Т. 16, № 3. — С. 264-268.
9. Удочкина Л.А. Экспериментальное выявление критических периодов в развитии щитовидной железы // *Фундаментальные исследования*. — 2006. — № 7. — С. 47-48.
10. Удочкина Л.А., Нуржанова С.С. Критерии оценки состояния слизистой оболочки десны в различных периодах онтогенеза / Л.А. Удочкина, С.С. Нуржанова // *Астраханский медицинский журнал*. — 2011. — Т. 6, № 3. - С. 257-258.
11. Чаговец Е.М. Влияние альфа2-макроглобулина на биосинтез ядерных белков в органах сублетально облученных животных / Е.М. Чаговец, С.Е. Хипко, И.Ф. Паскевич // *Радиобиология*. — 2006. — Т. 16, № 6. — С. 903-910.