

## НОВЫЙ ТЕСТ НА АЛЬФА2-МАКРОГЛОБУЛИН В ДИАГНОСТИКЕ ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ

Кривенцев Ю.А.<sup>1</sup>, Даутов И.Б.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВРО «Астраханский государственный медицинский университет Минздрава России», Астрахань, e-mail: [agma@astranet.ru](mailto:agma@astranet.ru);

<sup>2</sup>ГБУЗ АО «Областной клинический противотуберкулезный диспансер», Астрахань, e-mail: [guzoptd@mail.ru](mailto:guzoptd@mail.ru)

В ходе исследования разработан оригинальный способ выделения и очистки альфа2-макроглобулина, состоящий в последовательном фракционировании глобулинов плазмы крови беременных женщин добавлением сернокислого аммония до 40%, анионообменной хроматографии на сефадексе типа DEAE и гель-хроматографии на Toyopearl-65. Моновалентные антисыворотки к изучаемому белку, полученные иммунизацией кроликов, легли в основу смоделированного иммунохимического теста на альфа2-макроглобулин с порогом чувствительности  $1,63 \pm 0,08$  мг/л и воспроизводимостью, равной 97,2%. Оценка диагностической значимости теста на альфа2-макроглобулин показала его абсолютную специфичность и высокую диагностическую эффективность (97,9%), что доказывает его ценность как дополнительного параметра в диагностике, прогнозе и оценке качества терапии туберкулеза легких. Проведена широкая клиническая апробация предлагаемого теста на альфа2-макроглобулин на 390 пробах от 180 больных туберкулезом легких и здоровых доноров. Анализ показал значительное достоверное повышение средней концентрации альфа2-макроглобулина при различных формах туберкулеза легких в его активном течении, высокую прямую корреляцию уровня этого белка с объемом поражения паренхимы легких и высокую обратную корреляцию динамики его концентрации с течением туберкулезного процесса при успешном лечении.

Ключевые слова: альфа-2-макроглобулин, туберкулез легких, диагностика, иммунохимия, очистка.

## NEW TEST FOR ALPHA2-MACROGLOBULIN IN THE DIAGNOSIS OF PULMONARY TUBERCULOSIS

Kriventsev Y.A.<sup>1</sup>, Dautov I.B.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Astrachan State Medical University, Astrachan, e-mail: [agma@astranet.ru](mailto:agma@astranet.ru);

<sup>2</sup>Regional Clinical Antituberculosis Dispensary, Astrachan, e-mail: [guzoptd@mail.ru](mailto:guzoptd@mail.ru)

In the course of the study, an original method for isolating and purifying alpha2-macroglobulin was developed, consisting in the sequential fractionation of blood plasma globulins of pregnant women by adding ammonium sulfate up to 40%, ion-exchange chromatography on Sephadex DEAE type and gel chromatography on Toyopearl-65. Monovalent antisera to the studied protein, obtained by immunization of rabbits, formed the basis of a simulated immunochemical test for alpha2-macroglobulin with a sensitivity threshold of  $1.63 \pm 0.08$  mg/l and a reproducibility of 97.2%. The assessment of the diagnostic significance of the test for alpha2-macroglobulin showed its absolute specificity and high diagnostic efficiency (97.9%), which proves its value as an additional parameter in the diagnosis, prognosis and evaluation of the quality of pulmonary tuberculosis therapy. A wide clinical approbation of the proposed test for alpha2-macroglobulin was carried out on 390 samples from 180 patients with pulmonary tuberculosis and healthy donors. The analysis showed a significant significant increase in the average concentration of alpha2-macroglobulin in various forms of pulmonary tuberculosis in its active course, a high direct correlation of the level of this protein with the volume of damage to the lung parenchyma, and a high inverse correlation of the dynamics of its concentration with the course of the tuberculosis process with successful treatment.

Keywords: alpha-2-macroglobulin, pulmonary tuberculosis, diagnostics, immunochemistry, purification.

Начало XXI в. ознаменовано успехами по многим направлениям российской медицины, в том числе и фтизиатрии, что во многом обусловлено выполнением соответствующих государственных программ. Однако широкое распространение туберкулеза легких, ежегодно приводящее к длительной потере нетрудоспособности и даже инвалидизации десятков тысяч

работоспособных граждан нашей страны, до сих пор остается злободневной проблемой как в медицинской, так и в общегосударственной сферах [1, 2, 3, 4].

В этом аспекте выявление новых неселективных маркеров туберкулезного процесса, а также разработка на их основе оригинальных и простых биохимических тестов, способных оптимизировать стандартные схемы диагностики, прогноза и адекватного анализа качества лечения туберкулеза легких, безусловно, являются насущными задачами современной фтизиатрии.

Наиболее привлекательным в этом плане, на наш взгляд, является альфа2-макроглобулин (МГ) – тяжелый гликопротеид плазмы крови человека (молекулярная масса 820 кД), известный как острофазовый маркер. Кроме того, его уровень повышается у нефротических больных, у пациентов с псориазом, отторжением трансплантата, а снижение концентрации этого белка в сыворотке крови отмечается при панкреонекрозе, массивных ожогах, остеоартрозе ревматического генеза, вирусном гепатите [5, 6, 7].

По данным многих авторов, являясь активным ингибитором большинства известных протеолитических ферментов, МГ выполняет функцию выраженного иммуносупрессора, причем на уровне как клеточного, так и гуморального иммунитета [7, 8]. Основываясь на этих сведениях, мы выдвинули предположение, что такая патология, как туберкулез легких, довольно часто сопровождающаяся снижением иммунного статуса, может стимулировать индукцию гена МГ и, следовательно, приводить к достоверным изменениям уровня данного белка.

Цель исследования: создание, клиническая апробация и оценка диагностической значимости иммунохимического теста на альфа2-макроглобулин для диагностики туберкулеза легких.

### **Материалы и методы исследования**

В качестве материала в данном исследовании использовали сыворотку крови больных различными формами туберкулеза легких, которую получали в ГБУЗ АО «Областной клинический противотуберкулёзный диспансер» (клинический материал), а также человеческую плазму (в контрольной группе), получаемую в Астраханской областной станции переливания крови. Следует отметить, что для исследования брали материал только от больных с активным туберкулезным процессом, т.е. от пациентов с выраженной клинической картиной, манифестными данными рентгенографии и компьютерной томографии (КТ) легких, положительной реакцией на «Диаскинтест» и уровням С-реактивного белка (СРБ) не ниже 50 мг/л.

Всего исследовано 390 проб, из них: 336 образцов крови от 126 пациентов с туберкулезом легких и 54 – от доноров (табл. 1).

## Перечень материала по группам

| Материал                        | Образцы (n) | Пациенты (n) |
|---------------------------------|-------------|--------------|
| Туберкулез легких:              | 336         | 126          |
| очаговый туберкулез             | 112         | 44           |
| инфильтративный туберкулез      | 97          | 37           |
| диссеминированный туберкулез    | 53          | 19           |
| фиброзно-кавернозный туберкулез | 74          | 26           |
| Доноры (группы сравнения)       | 54          | 54           |
| <b>Всего</b>                    | <b>390</b>  | <b>180</b>   |

Проведено исследование 48 пациентов в динамике: на момент поступления в стационар, на 3-й месяц и по окончании интенсивного курса терапии (144 пробы) с позитивными результатами лечения, качество которого оценивали по нормализации клинических, рентгенологических и лабораторных данных.

Объем поражения легких, определяемый методом компьютерной томографии органов грудной клетки, вычислялся по авторской разработке как отношение количества пораженных сегментов к общему их числу – 19, которое затем переводили в проценты от общего объема легочной паренхимы. Пример: если у пациента обнаруживали патологические зоны активного туберкулеза, занимавшие в одном сегменте четверть объема, а в другом – половину, то общий объем поражения рассчитывался следующим образом:  $(1/4 + 1/2) / 19 \times 100 = 3,95\%$ .

Для очистки МГ применяли методы высаливания белков исходного материала (сыворотка крови беременных женщин (38–40 недель), доставляемая из ГБУЗ АО «Клинический родильный дом», Астрахань) серноокислым аммонием 40%-ного насыщения, анионообменной хроматографии на сефадексе типа DEAE A-50 в 0,01 М трис-НСl, рН 7,1 буфере а гель-проникающую хроматографию проводили на Тоуорearl-65 с использованием 0,14 М фосфатного буфера, рН 7,3.

Моноспецифические поликлональные антисыворотки на МГ получали иммунизацией кроликов породы «шиншилл» дробными дозами очищенного препарата МГ подкожно, в 4–5 точек в районах лимфоузлов, по следующей схеме: 4 введения с 5-дневными интервалами смеси антигенного материала с 2,5 мл полного адьюванта Фрейнда, 3 мг убитых туберкулезных палочек и 0,5 мл физраствора. Антиген вводили в возрастающих дозах: 12 – 24 – 48 – 64 мг. Контроль качества полученных антисывороток к МГ проводили методами иммунопреципитации и иммуноэлектрофореза. Титры полученных гипериммунных моновалентных антисывороток, определенные методом радиальной иммунодиффузии, составили 1/128.

Определение концентраций МГ как в очищенных препаратах, так и в клиническом материале проводили методом ракетного электрофореза на 1% на 0,05 М веронал-

мединаловом буфере рН-8,6 с додецилсульфатом натрия (ДСН) в авторской модификации [9, 10]. Порог чувствительности метода устанавливали по минимальной концентрации МГ в стандартной пробе, при которой еще визуально определялись электрофоретические пики. Уровень искомого протеина определяли с помощью калибровочной кривой, построенной на основании усредненных значений высоты пиков разгона проб с известной концентрацией МГ (от 0,5 до 1500 мг/).

Для оценки диагностической значимости разработанного теста на МГ использовали альтернативный тип референтной оценки с применением количественного результата трактовки. Дискриминантная концентрация (точка разделения) определялась как сумма средних числовых значений уровня МГ в контрольной группе и трехкратного среднеквадратического отклонения ( $M \pm 3\sigma$ ) по каждой из референтных групп. Чувствительность теста определялась как процент числа истинно положительных от суммы истинно положительных и ложноотрицательных результатов; специфичность – как процент числа истинно отрицательных от суммы ложноположительных и истинно отрицательных выявлений; воспроизводимость – как процент сходных значений (не выше  $\pm\sigma$ ) при повторных определениях идентичных проб; диагностическая эффективность – как половина суммы значений чувствительности и специфичности теста.

Статистический анализ полученных данных проводили при помощи лицензионного пакета Excel-2019 (Microsoft) с использованием общепринятых показателей: М (средняя величина), m (среднее отклонение), р (значимость различий), t (критерий Стьюдента), r (корреляционный коэффициент Пирсона), а также F (критерий Фишера) для дисперсионного анализа по клиническим выборкам.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

Настоящее исследование проводилось с 2017 по 2020 гг.

В ходе работы смоделирован новый алгоритм получения очищенного препарата МГ, включающий три простых и эффективных этапа: высаливание белковых компонентов исходного биоматериала добавлением  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  до 40%, анионообменное хроматографическое выделение на сефадексе типа DEAE A-50 с 0,01 М трис-НСl в качестве элюэнта при рН 7,1 с элюцией в нисходящем ступенчатом градиенте рН, а также гель-фильтрация на Toyopearl-65 с элюцией в 0,14 М фосфатном буфере при рН 7,3.

Степень чистоты препарата МГ, определяемая как процент его абсолютных средних величин (мг/л) к таковым по общему белку в очищенных препаратах, составила  $84,31 \pm 2,8\%$ , что соответствовало степени очистки в  $73,4 \pm 2,4$  раза.

На основе полученных самостоятельно специфических антисывороток к МГ и очищенного препарата этого белка разработан оригинальный иммунохимический тест на МГ

с порогом чувствительности  $1,63 \pm 0,08$  мг/л ( $p < 0,005$ ). Анализ многократных повторных определений уровня МГ в стандартных пробах очищенного препарата показал его высокую воспроизводимость – 97,2%.

Предлагаемый способ количественного определения МГ в сыворотке крови основывается на методе ракетного электрофореза в авторской модификации, заключающейся в добавлении ДСН в исследуемые пробы (до 2% концентрации). Как показал эксперимент, будучи активным анионным детергентом, ДСН увеличивает заряд белковых молекул, в том числе и МГ, и тем самым значительно повышает электрофоретическую подвижность этого «тяжелого» белка. Данной манипуляцией достигаются два позитивных эффекта, являющихся безусловным преимуществом теста: во-первых, существенно сокращается время проведения электрофоретического анализа (с 1,5 ч до 45–50 мин), во-вторых, увеличивается длина пиков преципитации, что повышает точность определения концентрации МГ.

Проведена широкая клиническая апробация иммунохимического теста на МГ в представленных выборках клинического материала (табл. 2).

Таблица 2

Результаты количественного определения МГ в выборках

| Исследуемые клинические группы  | n          | Концентрация МГ (мг/л) | Критерий Стьюдента (t) | Коэффициент дисперсии (F) |
|---------------------------------|------------|------------------------|------------------------|---------------------------|
| Очаговый туберкулез             | 112        | $815,8 \pm 32,24$      | 4,14<br>$p < 0,05$     | 5,1                       |
| Инфильтративный туберкулез      | 97         | $857,4 \pm 28,16$      | 5,32<br>$p < 0,01$     | 5,4                       |
| Диссеминированный туберкулез    | 53         | $982,3 \pm 35,27$      | 5,63<br>$p < 0,01$     | 6,2                       |
| Фиброзно-кавернозный туберкулез | 74         | $739,1 \pm 30,48$      | 4,75<br>$p < 0,05$     | 4,9                       |
| Здоровые                        | 54         | $318,2 \pm 22,13$      | –                      | –                         |
| <b>Всего</b>                    | <b>390</b> |                        |                        |                           |

Математический сравнительный анализ сопоставляемых парных средних по клиническим выборкам по отношению к результатам в группе сравнения, а также уровней дисперсии показал высокую статистическую значимость в исследуемых выборках. Различия средних концентраций МГ между всеми клиническими группами и контрольной группой оказались достоверными ( $p < 0,05$ ).

Выявлена высокая прямая корреляция между средними значениями МГ в каждой выборке и соответствующими средними объемами поражения паренхимы легких активным туберкулезным процессом (без учета фиброзных изменений), что свидетельствует о значимости МГ как маркера активного туберкулеза легких (табл. 3).

Было также проведено количественное определение уровня МГ в динамике у пациентов с позитивным течением патологического процесса, свидетельствующим об успешности проводимого лечения. В представленных клинических группах исследование показало удовлетворительные значения обратной корреляции между концентрацией МГ и сроками терапии (за исключением больных с фиброзно-кавернозной формой, где величина  $r$  оказалась на грани достоверности) (табл. 3).

Таблица 3

Анализ корреляционных отношений по группам

| Исследуемые группы              | Корреляция ( $r$ ) уровня МГ с объемом поражения легких | Корреляция ( $r$ ) уровня МГ с течением процесса в ходе лечения |
|---------------------------------|---|---|
| Очаговый туберкулез             | 0,76  | -0,72   |
| Инфильтративный туберкулез      | 0,78  | -0,85   |
| Диссеминированный туберкулез    | 0,74  | -0,69   |
| Фиброзно-кавернозный туберкулез | 0,72  | -0,42   |

Данный факт свидетельствует о безусловной ценности МГ как маркера качества лечения.

На наш взгляд, выраженное повышение среднего уровня МГ у больных туберкулезом легких объясняется ключевой ролью этого белка в формировании иммунного статуса человека, что было показано нами ранее [8]. Неудивительно, что, будучи выраженным иммуносупрессором, этот протеин чутко реагирует на активный туберкулезный процесс, который, как правило, развивается на фоне подавленного иммунитета. Если учесть активную роль МГ в формировании иммунологической толерантности беременных женщин [8], не исключено, что этот белок также участвует в процессах иммунологической супрессии при туберкулезе легких. Снижение средних значений МГ в сыворотке крови пациентов в процессе успешного лечения тоже укладывается в данную гипотезу.

На заключительном этапе исследования проведена оценка качества теста на МГ как нового диагностическо-прогностического инструмента для фтизиатрии с учетом альтернативной количественной характеристики результатов. Расчет дискриминантной концентрации дал значение  $371 \pm 34,6$  мг/л. Анализ диагностической значимости предлагаемого теста на МГ по основным показателям дал следующие результаты: чувствительность – 95,8%; прогностичность отрицательного результата – 79,4%; диагностическая эффективность – 97,9%; специфичность – 100%; прогностичность положительного результата – 100%.

Данные результаты объясняются полным отсутствием ложноположительных срабатываний и доказывают клинико-лабораторную ценность нового теста на МГ.

### **Заключение**

Включение нового селективного, чувствительного, воспроизводимого и эффективного иммунохимического теста на альфа2-макроглобулин в стандартную панель диагностики и оценки течения туберкулеза легких в качестве дополнительного параметра, несомненно, облегчит клинико-диагностический мониторинг данной патологии.

### **Список литературы**

1. Тюлькина Е.А. Фактическая функция врачебной должности врача-фтизиатра в удмуртской республике // Современные проблемы науки и образования. 2017. № 6. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=27156> (дата обращения: 10.03.2022).
2. Тевосян С.Т., Борисов Н.В., Груздева Е.С. Туберкулез как актуальная медико-социальная проблема // Молодой ученый. 2019. № 7 (245). С. 143-145.
3. Веневцева Н.В., Кондусова Ю.В., Князева А.М., Пятницина С.И. Туберкулез как общественное опасное заболевание. Вопросы профилактики // Приднепровский научный вестник. 2018. Т. 10. № 3. С. 024-026.
4. Барканова О.Н., Гагарина С.Г., Калуженина А.А. Туберкулез в сочетании с covid-19 // Лекарственный вестник. 2021. Т. 15. № 2 (82). С. 33-37.
5. Kumar N.P., Thiruvengadam K., Sivakumar S., Hissar S., Babu S., Moideen K., Nancy A., Viswanathan V., Kornfeld H. Acute Phase Proteins Are Baseline Predictors of Tuberculosis Treatment Failure. *Frontiers in Immunology*. 2021. vol. 12. no. MAR. P. 731878.
6. Зорина В.Н., Школьникова Т.В., Короткий Н.Г., Зорина Р.М., Бурдина А.В., Коняхина И.Г., Зорин Н.А. Альфа-2-макроглобулин, лактоферрин и некоторые цитокины при псориазе // Иммунология. 2014. Т. 35. № 1. С. 21-23.
7. Зурнаджянц В.А., Кчибеков Э.А., Коханов А.В., Сердюков М.А., Алексашина Д.С., Луцева О.А. К вопросу о значении теста на  $\alpha$ 2-макроглобулин для своевременной диагностики тяжести воспалительного процесса в поджелудочной железе // Медицинский вестник Северного Кавказа. 2016. Т. 11. № 3. С. 405-408.
8. Кривенцев Ю.А., Носков А.И., Осыко С.В. и др. Иммунохимический тест на альфа2-макроглобулин в оценке иммунного статуса человека // Современные проблемы науки и образования. 2016. № 3. [Электронный ресурс]. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=24622> (дата обращения: 10.03.2022).

9. Кривенцев Ю.А., Никулина Д.М., Бисалиева Р.А. Иммунохимический анализ концентрации фетального гемоглобина в крови новорожденных мальчиков и девочек с внутриутробной гипоксией // Омский научный вестник. 2006. Т. 46. № 9. С. 272-274.
10. Никулина Д.М., Кривенцев Ю.А., Бисалиева Р.А., Лапеко С.В. Новый иммунохимический тест для лабораторной оценки состояния эритронов // Клиническая лабораторная диагностика. 2009. № 12. С. 27-30.