

Иммуноферментный диагностический набор для определения растворимого Fas/Apo (CD-95)-антигена в сыворотке крови

Н.В. Москалёва, О.Л. Тумаш, С.В. Жаворонок, А.Ю. Барышников

Белорусская медицинская академия последипломного образования¹, Минск, Беларусь

Гомельский государственный медицинский университет², Гомель, Беларусь

Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН³, Москва, Россия

The immune-enzyme diagnostic set for definition of soluble Fas/Apo (CD95)-antigen in blood serum

N.V. Moskaliova, O.L. Tumash, S.V. Zhavoronok, A.Y. Baryshnikov

The Byelorussian Medical Academy of Post Graduate Education¹, Belarus

The Gomel State Medical University², Belarus

The Russian cancer research center of N.N.Blohin of the Russian Academy of Medical Science³, Russia

Аннотация

Разработан и охарактеризован иммуноферментный диагностический набор для качественного определения растворимого антигена Fas/Apo (CD95) (sFas/Apo (CD95)) в сыворотке крови. Подобраны оптимальные условия проведения иммуноферментной реакции. Произведена оценка клинико-диагностической значимости определения sFas/Apo (CD95) в сыворотке крови у больных ВИЧ-инфекцией. Выявлено, что частота определения повышенных уровней sFas/Apo в сыворотке крови ВИЧ-инфицированных больных статистически значимо выше, чем у практически здоровых людей. Выявлена статистически значимая зависимость между частотой определения повышенных уровней sFas и возрастом ВИЧ-инфицированных пациентов. Установлено, что повышенные уровни sFas в сыворотке крови выявлялись статистически значимо чаще у больных на более поздних стадиях ВИЧ-инфекции. Полученные данные, подтверждают перспективность более глубокого изучения закономерностей циркуляции sFas/Apo (CD95)-антигена в сыворотке крови для прогнозирования неблагоприятного течения и исходов ВИЧ-инфекции и других заболеваний.

Ключевые слова:

Иммуноферментный диагностический набор, растворимый антиген sFas/Apo (CD-95), ВИЧ-инфекция.

Механизмы апоптоза стали более доступны пониманию, в частности с открытием Fas/Apo (CD-95)-антигена [1]. CD-95 экспрессируется

Summary

The immune-enzyme diagnostic set for definition of soluble antigen Fas/Apo (CD95) in serum of blood is developed and characterized. The estimation of carrying out immune-enzyme reactions optimum conditions is picked up. The estimation of the clinic-diagnostic importance of soluble antigen Fas/Apo (CD95) (sFas/Apo (CD95)) in serum of blood at sick HIV-infections definition is made. It is revealed, that frequency of the sFas raised levels in serum of blood of an HIV-infected patient's definition statistically significantly above, than at practically healthy persons. Statistically significant dependence between frequency of the sFas raised levels revealing and age of a HIV-infected patients is revealed. It is established, that the sFas raised levels in serum of blood came to light statistically significantly more often at patients at later stages of a HIV-infection. The obtained data, confirm perspectivity of deeper studying of sFas/Apo (CD95)-antigene circulation laws in serum of blood for forecasting of an adverse current and outcomes of HIV-infection and other infectious diseases.

Key words:

The immune-enzyme diagnostic set, soluble antigen sFas/APO (CD95), HIV-infection.

на поверхности клеток многих типов: на тимоцитах, лимфобластных клеточных линиях, активированных Т- и В-лимфоцитах, а также на

фибробластах, гепатоцитах, кератиноцитах, миелоидных клетках и клетках нервной системы. Белок Fas/Apo-(CD-95) - трансмембранный гликопротеин первого типа принадлежит к семейству рецепторов фактора некроза опухолей (ФНО) и содержит 3 повтора аминокислотной последовательности, богатых цистеином. В его структуре выделяют следующие регионы: экстрацеллюлярный, трансмембранный и интрацеллюлярный. Выявлено, что периферические клетки крови и некоторые опухолевые клеточные линии, кроме полноразмерной Fas-мРНК, имеют варианты РНК, полученные в результате альтернативного сплайсинга. Они кодируют растворимый Fas-антиген (sFas). Мономерные формы sFas блокируют центры связывания на Fas-лиганде, делая их недоступными для мембранного CD-95 антигена – апоптоз не инициируется. Апоптозу препятствует и формирование мембранных Fas-олигомеров с участием растворимого CD-95-мономера [2].

Рост числа исследований и накопление информации об усилении экспрессии Fas при различных патологических процессах, обусловило интерес к проведению исследований его растворимой формы, с целью выявления корреляционных связей sFas с основными клиническими показателями, а также с целью использования его в качестве дополнительного диагностического и прогностического критерия в оценке активности патологического процесса при ряде заболеваний [3]. Следует отметить, что большинство имеющихся публикаций посвящено изучению его экспрессии, и лишь в некоторых работах последних лет представлена информация по определению растворимой формы sFas/Apo.

Ведущая роль процессов апоптоза в иммунопатогенезе ВИЧ/СПИД признается сегодня множеством ученых. Сделано предположение, что при ВИЧ-инфекции наблюдается значительный дисбаланс в системе «CD95 и его лиганд», способствующий повышению чувствительности лимфоцитов к апоптозу [4,5]. Показана возможность его использования в качестве дополнительного прогностического лабораторного критерия для выявления резистентности к АРВ препаратам у ВИЧ-инфицированных детей [6].

Исследования sFas стали возможными благодаря получению моноклональных антител (МКА). В частности, получение таких МКА (клон ICO-160) проводится на базе Российско-

го онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН г. Москва в лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей [7]. На основе МКА с высокой специфичностью к Fas/Apo (CD-95) конструируются высокочувствительные иммуноферментные тест-системы [4,8]. Однако, недостаточная изученность клинико-диагностического значения sFas/Apo, высокая стоимость диагностических наборов коммерческих производителей ограничивает их широкое использование в клинической практике. Это предполагает необходимость конструирования альтернативных вариантов иммуноферментных тест-систем и более глубокого изучения закономерностей циркуляции sFas/Apo (CD95)-антигена в сыворотке крови, с целью оценки клинико-диагностической и прогностической значимости данного маркера апоптоза при ВИЧ-инфекции и других заболеваниях. В настоящее время разработано множество вариантов иммуноферментного анализа (ИФА), имеющих как принципиальные, так и второстепенные отличия. Твердофазный «сэндвич» - вариант ИФА является наиболее распространенным для определения антигенов, обладающих более чем одной распознаваемой антигенами детерминантой. В процессе анализа антиген как бы «зажат» между молекулами антител, что и обусловило название метода «сэндвич». Это название теперь используется практически во всей литературе на правах официального термина. Основным достоинством «сэндвич» - варианта является высокая чувствительность, превышающая возможности других схем твердофазного ИФА [9].

Настоящая статья посвящена описанию технологии разработки такого диагностического набора и оценке возможности его клинического применения у больных ВИЧ-инфекцией.

Цель исследования

Разработать и охарактеризовать диагностический набор «сэндвич» - ИФА для качественного определения растворимого антигена Fas/Apo (CD95) в сыворотке крови. Подобрать оптимальные условия проведения иммуноферментной реакции, оценить воспроизводимость, разработанного диагностического набора. Исследовать образцы сывороток крови различных групп ВИЧ-инфицированных больных. Оценить клинико-диагностическую значимость определения sFas/Apo (CD95) в сыворотке крови больных ВИЧ-инфекцией.

Материалы и методы

Материалом для исследований, при конструировании тест-системы и изучении ее иммунохимических характеристик служили полистироловые планшеты («DYNATECH», США; «NUNC», Дания; «ВНИИ Белполимер», Беларусь); фосфатно-солевой буфер (ФСБ-Т) (рН 7.2), содержащим 0,1% Tween 20; 0,01 М карбонатный буфер (рН 9,6); 1% раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) в ФСБ-Т (рН 7.2); субстрат, содержащий 5 мг ортофенилендиамина (ОФД), 10 мл 0,1 М цитратного буферного раствора с 0,3% перекисью водорода; субстрат тетраметилбензидин (ТМБ); 5% раствор серной кислоты; пероксидаза хрена (ПХ) (RZ=3,6); МКА к sFas/APO (CD95)-антигену (клон ICO-160) («Медбиоспектр»).

В качестве исследуемого материала, для оценки параметров, разрабатываемой тест-системы ИФА, служили образцы сывороток ВИЧ-инфицированных беременных женщин, верифицированные методом ИФА с использованием коммерческого диагностического набора для количественного определения человеческого sFAS-лиганда (human sAPO-1/Fas ELISA, BMS245) производства «Bender MedSystems GmbH» («BMS») (Австрия).

При проведении оценки практической значимости разработанного диагностического набора, исследуемым материалом служили сыворотки 91 ВИЧ-инфицированного больного. Из них 69 (76%) человек – взрослые (средний возраст $32,2 \pm 7,9$) и 22 (24%) человек – дети (средний возраст $7,3 \pm 4,1$). Среди взрослых 20 (29%) составили мужчины и 49 (71%) женщины (из них 8 (16%) женщин на момент обследования были беременные). На момент обследования находились на антиретровирусной терапии (АРТ) 31 (45%) ВИЧ-инфицированный взрослый и 17 (77%) детей. Беременные ВИЧ-инфицированные женщины не получали АРТ. Среди всех ВИЧ-инфицированных пациентов, находящихся на АРТ, 16 (33%) больным (10 (62%) взрослых и 6 (38%) детей) проводилась смена схемы АРТ два и более раз. А также 15 образцов сывороток больных вирусным гепатитом С на разных стадиях заболевания.

Контрольную группу составили 20 практически здоровых безвозмездных доноров (10 (50%) мужчин и 10 (50%) женщин) в возрасте 23-45 лет (средний возраст – $30,5 \pm 1,9$). Для исследования использовали сыворотку

крови из периферической вены. После свертывания крови пробирки центрифугировали при 3000xg в течение 15 мин., сыворотку крови отбирали и хранили при -20°C до проведения исследования.

Учёт иммуноферментной реакции производили с помощью спектрофотометра АИФ М/340 («Витязь», Беларусь).

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием программы STATISTICA v.6.

Результаты и их обсуждение

Для определения оптимальных условий проведения иммуноферментной реакции исследовали различные варианты используемых реагентов и параметры их применения. Разработка диагностического набора ИФА для определения sFas/APO (CD95) в сыворотке крови заключала в себя следующие этапы: получение сенсibilизированного планшета; подбор, верифицированных при помощи коммерческого диагностического набора, сывороток крови для использования в качестве контрольных образцов; подбор оптимальных условий проведения ИФА; методика учета реакции; интерпретация результатов.

Сыворотки крови ВИЧ-инфицированных беременных женщин, исследованные коммерческим диагностическим набором для количественного определения sFAS производства «BMS» (Австрия) и имеющие наибольшую концентрацию sFas, были отобраны нами для использования в качестве «положительного контрольного образца» (К+). Для приготовления «отрицательного контрольного образца» (К-) использовали сыворотки крови, также обследованные с помощью данного коммерческого набора, но имеющие отрицательные результаты по содержанию sFas, а также сыворотки крови, полученные от здоровых безвозмездных доноров.

Для исследований был получен конъюгат МКА к sFas/APO (CD95) с пероксидазой хрена (ПХ) (RZ=3,6) методом периодатного окисления фермента по Р.К. Nakane [10]. В иммуноферментном анализе использовали три партии конъюгата, полученных в разное время и с использованием ПХ различных производителей.

На первом этапе разработки произвели сенсibilизацию твердой фазы (полистироловые планшеты). Опытным путем установили, что проведение сенсibilизации планшет без пред-

варительной обработки ультрафиолетовым облучением (УФО), дает более низкие фоновые показатели сывороток крови. В то же время 6 (63%) заведомо позитивных сывороток (определены как позитивные коммерческой тест-системой «BMS» (Австрия)) показали ложнонегативные результаты. Средние коэффициенты позитивности тестируемых сывороток были достоверно ниже, чем у сывороток крови, проанализированных коммерческим диагностическим набором. Для сравнения результатов ИФА между собой был выбран метод отношения, для чего использовали коэффициент позитивности (КП) – зависимую переменную: отношение оптической плотности (ОП) образцов (ОПобр.) к ОП критической (ОПкрит.) $KП = ОПобр./ОПкрит.$ Критерием эффективности считали достижение максимального значения КП [11]. ОПкрит. рассчитывали, ориентируясь на коммерческий диагностический набор сравнения («BMS» (Австрия)): ОП негативного контроля + 0,2.

После обработки УФО планшета все 6 сывороток крови, давшие ложнонегативные результаты при исследовании без предварительной обработки, определились как позитивные. Кроме того, в 3,4 раза увеличился средний КП (различия между средними значениями КП сывороток крови с предварительной обработкой планшета УФО и без обработки статистически значимы (Wilcoxon Matched

Pairs Test, $p < 0,001$). В дальнейшем сорбцию МКА против sFas/АРО (CD95) проводили в полистироловых планшетах, предварительно обработанных УФО.

На следующем этапе разработки, учитывая опыт дизайна аналогичных иммуноферментных тест-систем [4,12,13,14], произвели подбор концентрации МКА для сорбции. Для подбора оптимальных условий сорбции, оценивали интенсивность иммуноферментной реакции при следующих концентрациях МКА в растворе: 2; 5, и 8 мкг/мл. В качестве тестируемых образцов использовали «положительный» и «отрицательный» контрольные образцы сывороток крови. Был проведен подбор концентрации сорбции МКА при параллельном тестировании различных разведений конъюгата (табл.1).

Средний и наиболее приемлемый показатель ОП sFas «отрицательного» контрольного образца, не превышающий граничное значение 0,158 единиц оптической плотности (е.о.п.), был выявлен при разведении конъюгата 1:800 и концентрации сорбированных МКА 5 мкг/мл. Средний и наиболее приемлемый показатель ОП sFas «положительного» контрольного образца, не ниже 0,2 е.о.п., также был получен при разведении конъюгата 1:800 и концентрации сорбированных МКА 5 мкг/мл. Таким образом, данное разведение конъюгата, при исходной концентрации сорбированных МКА 5 мкг/мл, было со-

Таблица 1. Влияние различных концентраций МКА для сорбции и при различных разведениях конъюгата на величину оптической плотности исследуемых образцов сывороток крови

Сыворотки крови	Конъюгат разведение 1:	Значения оптической плотности		
К-	3200	0,06	0,049	0,105
К-	1600	0,13	0,111	0,144
К-	800	0,132	0,095	0,158
К-	400	0,144	0,135	0,161
К-	200	0,163	0,128	0,186
К-	100	0,197	0,168	0,208
К+	3200	0,392	0,574	0,602
К+	1600	1,171	1,215	1,176
К+	800	0,958	1,665	1,406
К+	400	1,354	1,727	1,837
К+	200	0,853	1,969	2,095
К+	100	1,453	2,177	2,936
Концентрация МКА, мкг/мл		2	5	8

чено оптимальным и использовано для дальнейшей работы.

На следующем этапе разработки методики ИФА, учитывая опыт дизайна аналогичных иммуноферментных тест-систем [4,12,13,14], произвели подбор времени инкубации с конъюгатом при 37°C. Время инкубации составило 30,60 и 90 мин. соответственно. Критерием также являлось достижение максимального значения К.

Минимальные показатели КП наблюдались при инкубации с конъюгатом в течение 30 мин., различия статистически значимы с показателями КП при инкубации в течение 60 и 90 мин. (Wilcoxon Matched Pairs Test, $p=0,005$). Максимальные показатели КП наблюдались при инкубации с ТМБ в течение 60 и 90 минут, но различия между группами статистически не значимы (Wilcoxon Matched Pairs Test, $p=0,07$). Учитывая полученные данные, для дальнейшей работы нами выбрана инкубация с конъюгатом в течение 60 минут, как наиболее оптимальная (рис.1).

С помощью разработанного иммуноферментного набора исследовали 32 образца сывороток крови ВИЧ-инфицированных беременных женщин, верифицированные коммерческим диагностическим набором для количественного определения sFas «BMS» (Австрия), из которых 22 образца сывороток крови имели положительные результаты по содержанию sFas, а 10 образцов – отрицательные результаты. В результате исследования

все 22 позитивных образца сывороток крови дали положительные результаты по содержанию sFas, показатели ОП превышали пороговое значение 0,2 е.о.п. При этом показатели ОП в пределах 0,2-0,5 е.о.п. встречались лишь у 4% больных; в пределах 0,5-1,0 е.о.п – у 46% больных ; в пределах 1,0-1,5 е.о.п – у 18% больных; в пределах 1,5-2,0 е.о.п – у 5% больных; у 27% больных показатели ОП sFas превышали 2,0 е.о.п. Среднее значение ОП составило 1,313 е.о.п. Все 10 отрицательных по содержанию sFas образцов сывороток крови дали отрицательные результаты. Показатели ОП не превышали пороговое значение 0,158 е.о.п. и средний показатель ОП отрицательных образцов составил 0,085 е.о.п. Соотношение среднего показателя ОП позитивных образцов к среднему показателю ОП негативных составило 16,0 что сопоставимо с соотношением ОП при использовании коммерческого диагностического набора «BMS» (Австрия).

Расчёт граничного значения учета результатов исследования произвели, используя пул сывороток крови практически здоровы безвозмездных доноров.

Разброс минимальных и максимальных значений ОП sFas составил от 0,035 до 0,195 е.о.п., среднее значение ОП составило 0,076 е.о.п. Разница между максимальным показателем ОП 0,195 е.о.п. и минимальным средним составила 0,126 е.о.п., добавив 25% к данному значению (% серой зоны) получим показатель 0,158 (таблица 2).

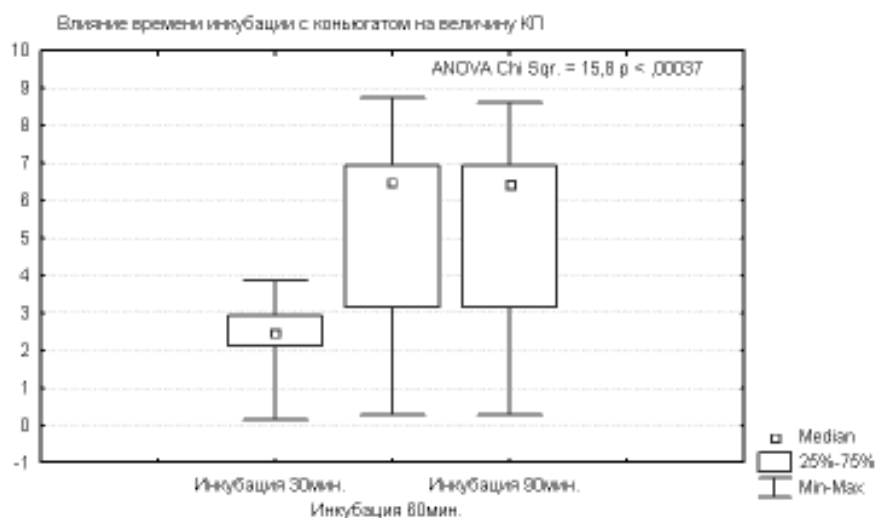


Рис. 1. Влияние времени инкубации с конъюгатом на величину коэффициента позитивности.

Таблица 2. Анализ значений показателей ОП негативных по sFas/Аро-антигену сывороток крови доноров (описательная статистика)

Среднее	0,076
Стандартная ошибка	0,0029
Медиана	0,069
Мода	0,069
Стандартное отклонение	0,029
Дисперсия выборки	0,0008
Экссесс	3,46
Асимметричность	1,69
Интервал	0,16
Минимум	0,035
Максимум	0,195
Сумма	7,289
Счет	96
Наибольший	0,195
Наименьший	0,035
Уровень надежности(95,0%)	0,00582

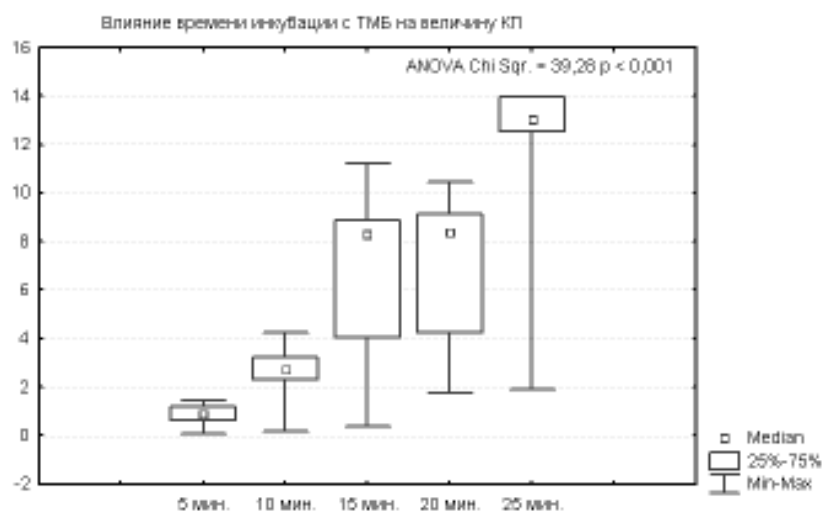
Данный показатель мы в дальнейшем и будем использовать для расчёта пограничного значения. Из полученных данных также следует, что значения отрицательного образца сыворотки крови не должны превышать 0,158 е.о.п. Минимальное значение показателя для позитивного образца сыворотки крови установили как двукратный коэффициент для негативного контроля, но не менее 0,2 е.о.п. Исходя из полученных данных ИФА и с учётом опыта

разработчиков аналогичных тест-систем [4,12,13,14], для регистрации результатов реакции применяли следующие параметры: контрольные образцы должны были иметь показатели оптической плотности: ОП К+ не ниже 0,2 е.о.п., ОП К- – не выше 0,158 е.о.п., граничное значение рассчитывали следующим образом: ОПср.К- + 0,158, где ОПср. К- среднее значение оптической плотности К-. [11].

Произвели оценку эффективности применения различных хромогенов субстратной смеси для наилучшего учета результата ИФА, в частности ТМБ и ОФД. Использование ТМБ в качестве хромогена, является более эффективным, по сравнению с использованием ОФД, что отразилось в увеличении среднего коэффициента позитивности в 2,2 раза (Wilcoxon Matched Pairs Test, $p < 0,001$).

На следующем этапе был изменён лишь один показатель – время инкубации с ТМБ, который ранее на всех этапах эксперимента составлял 30 минут, при остальных параметрах (концентрация сорбции, время первой и второй инкубаций, концентрация конъюгата) остававшихся неизменными. Критерием также являлось достижение максимального значения К (рисунок 2).

Минимальные коэффициенты позитивности наблюдались при инкубации с ТМБ в течение 5 и 10 мин., различия статистически значимы со значениями КП при инкубации в течение 15 и 20 и 25 мин. (Wilcoxon Matched Pairs Test, $p < 0,05$). Показатели ОП для позитивных образцов при

**Рис. 2. Влияние времени инкубации с ТМБ на величину коэффициента позитивности**

инкубации с ТМБ в течение 5 мин. не выходили на уровень позитивных. Максимальные показатели КП наблюдались при инкубации с ТМБ в течение 15 и 20 мин., но различия между группами статистически не значимы (Wilcoxon Matched Pairs Test, $p > 0,05$). Показатели ОП для позитивных образцов сывороток крови при инкубации с ТМБ в течение 25 мин. превышали пороговое значения прибора (составляли более чем 3,0 е.о.п.) АИФ М/340, а показатели ОП для негативных образцов сывороток крови превышали допустимое пороговое значение 0,158 е.о.п. (Таблица 3).

Для дальнейшей работы нами выбрана инкубация с ТМБ в течение 15 минут, как наиболее оптимальная.

Произвели оценку влияния сорбционной способности полистироловых планшетов, используемых в качестве твердой фазы при постановке ИФА, различных производителей на величину

ОП исследуемых образцов сывороток крови. Исследовали сыворотки крови в трех постановках, при соблюдении одинаковых условий проведения иммуноферментной реакции, но с использованием полистироловых планшетов разных производителей: «DYNATECH» (Германия), «NUNC» (Дания), «Белполимер» (Беларусь). Критерием также являлось достижение максимального значения К. Выявлены статистически значимые различия между средними показателями КП сывороток крови ($p < 0,0015$: «DYNATECH» и «NUNC» $p = 0,012$; «DYNATECH» и «Белполимер» $p = 0,036$; «NUNC» и «Белполимер» $p = 0,013$, Wilcoxon Matched Pairs Test,) (Рис. 3).

При использовании планшетов фирмы «Белполимер» показатели ОП sFas позитивных образцов сывороток крови превышали пороговый уровень 0,2 е.о.п. Показатели ОП отрицательных образцов сывороток крови не превы-

Таблица 3. Оценка статистической значимости различий средних значений КП при различном времени инкубации с ТМБ

Время инкубации с ТМБ, мин.	Значение p (Wilcoxon Matched Pairs Test) ($p < 0,05$)			
5				
10	0,005			
15	0,005	0,005		
20	<0,001	0,002	0,074	
25	<0,001	0,002	0,002	0,002

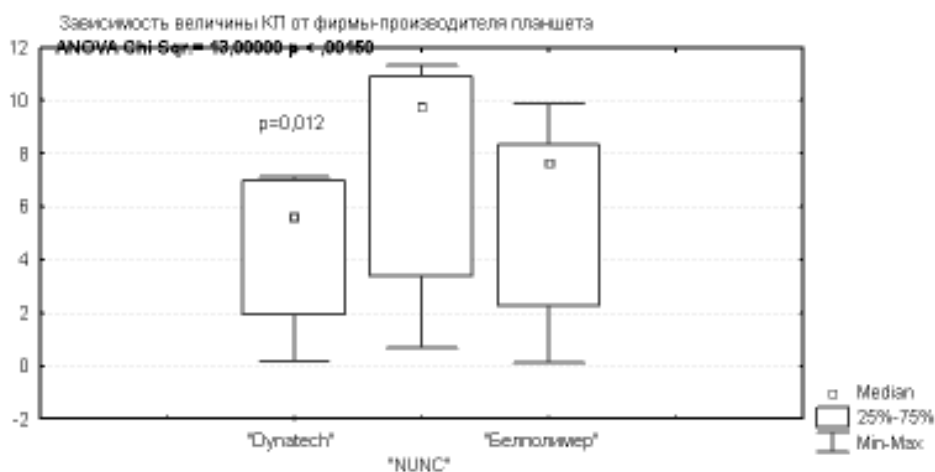


Рис. 3. Зависимость величины КП от фирмы-производителя полистиролового планшета, используемого в качестве твердой фазы при постановке ИФА

шали 0,158 е.о.п. При использовании планшетов фирмы «NUNC» наблюдались наивысшие показатели ОП у позитивных образцов сывороток крови. Однако, определялись значения ОП (>3,0), которые были выше порогового уровня ИФА-анализатора, что является нежелательным для работы, так как не позволяет определить точное значение ОП. Показатели ОП отрицательных образцов сывороток крови превышали 0,158 е.о.п. Постановка с использованием планшетов фирмы «DYNATECH» показала, что показатели ОП позитивных образцов сывороток крови были статистически значимо ниже значений ОП, измеренных при использовании планшетов других производителей. При этом показатели ОП отрицательных образцов сывороток крови не превышали 0,158 е.о.п. Для дальнейших исследований нами выбраны планшеты фирмы «Белполимер», как наиболее оптимальные для определения sFas в сыворотке крови.

С целью оценки воспроизводимости результатов определения концентрации sFas в сыворотке крови с помощью разработанного сэндвич-ИФА проводили определение уровня sFas в 8 различных образцах сывороток крови в 10 параллельных повторах для каждого образца в пределах одного ИФА-планшета (intra-assay) и рассчитывали коэффициент вариации [15]. Коэффициент вариации изменялся от 1,0% до 6,5% и в среднем составил 3,3%. Полученные данные подтверждают высокую воспроизводимость результатов измерения sFas в данном виде теста. Эксперимент повторяли 5 раз в независимых экспериментах (inter-assay) и рассчитывали коэффициент вариации для данного теста, учитывая результаты 40 определений для каждого образца сыворотки крови. Коэффициент вариации изменялся от 1,5% до 6,7% и в среднем составил 3,7%. Полученные данные также свидетельствуют о высокой воспроизводимости результатов измерения sFas в данном виде теста.

В результате проведенных исследований и с учетом анализа литературных данных [4,12,13,14], были определены условия проведения ИФА. МКА к sFas/Apo (CD95) сорбировали в лунки полистиролового планшета в 0,01 М карбонатном буфере (рН 9,6) в концентрации 5 мкг/мл в течение 18 часов при 4°C. Затем промывали трехкратно фосфатно-солевым буфером (ФСБ-Т) (рН 7.2), содержащем 0,1% Tween 20 (буфер для отмывки). Снова промывали трехкратно ФСБ-Т. Для блокирования остаточных свободных центров связывания план-

шеты инкубировали с 1% раствором бычьего сывороточного альбумина (БСА) в ФСБ-Т (рН 7.2) 60 мин. при 37°C. Снова промывали трехкратно ФСБ-Т. Затем в лунки планшета вносили сыворотки больных, инкубировали 60 мин. во влажной камере при температуре 37°C. Планшеты промывали раствором ФСБ-Т четырехкратно. Процедуру отмывки далее повторяли после каждой стадии теста. После промывания в лунки планшета вносили конъюгат ПХ с МКА к sFas/APO (CD95) в рабочем разведении 1:800 в буфере для отмывки. Планшет инкубировали 1 час при 37°C. В качестве субстрата использовали свежеприготовленный раствор ТМБ в рабочей концентрации. Время инкубации составило 15 минут при комнатной температуре в темноте до развития окраски. Реакцию останавливали 10% серной кислотой, ОП измеряли при длине волны 450 нм на спектрофотометре АИФ М/340 «Витязь».

Оценка практической значимости разработанного иммуноферментного набора.

Частота выявления повышенных уровней sFas в сыворотке крови практически здоровых безвозмездных доноров составила 10%, показатели его ОП варьировали в пределах 0,093-0,661 е.о.п., а средний показатель составил $0,232 \pm 0,137$ е.о.п.

Повышенные уровни ОП sFas в пределах 0,302-2,507 е.о.п. были обнаружены в образцах сыворотки крови 34 (37%) ВИЧ-инфицированных пациентов, среди них 1 (3%) беременная женщина и 9 (26%) детей. Средний показатель ОП $0,952 \pm 0,684$ е.о.п. был статистически значимо выше соответствующего показателя в контрольной группе (Mann-Whitney U Test, $p < 0,001$). У ВИЧ-инфицированных мужчин частота выявления повышенных уровней sFas составила 31%, Показатели ОП его колебались в пределах 0,336-2,331 е.о.п. и в среднем составили $0,828 \pm 0,240$ е.о.п. У женщин повышенные уровни sFas выявлялись несколько реже (20% наблюдений), при этом показатели ОП колебались в пределах 0,302-2,507 е.о.п., в среднем - $0,944 \pm 0,243$ е.о.п.

У ВИЧ-инфицированных детей повышенные уровни sFas/Apo выявлялся значимо чаще, чем у взрослых и составил 41% (Mann-Whitney U Test, $p = 0,002$). Показатели ОП колебались в пределах 0,513-2,375 е.о.п. и в среднем составили $1,182 \pm 0,246$ е.о.п.

Частота выявления повышенных уровней sFas в сыворотке крови ВИЧ-инфицированных

больных зависели от стадии заболевания (для постановки стадии заболевания использовалась классификация СДС 1993 года для взрослых и 1994 года для детей). На стадиях А1, А2, А3, В1, С1 повышенных уровней sFas в сыворотке крови не было выявлено. Показатели ОП sFas/Аро-антигена у ВИЧ-инфицированных больных на В2 стадии варьировали в пределах 0,01-1,270 е.о.п. и в среднем составили 0,181 (0,363) е.о.п., а частота выявления в данной группе – 42% (5 больных). Из 17 образцов сывороток крови больных на стадии В3 повышенные уровни sFas/Аро выявлены у 9(53%) пациентов, показатели ОП варьировали в пределах 0,109-

2,507 е.о.п. и в среднем составили 0,343 (0,635) е.о.п. Показатели ОП sFas/Аро на С2 стадии варьировали в пределах 0,674-1,501 е.о.п. и в среднем составили 1,088 (0,585) е.о.п., а частота выявления в данной группе – 100% (3 пациента). У 9(60%) больных из 15 на стадии С3 выявлены повышенные уровни sFas/Аро-антигена в сыворотке крови, показатели ОП варьировали в пределах 0,137-2,331 е.о.п. и в среднем составили 0,366 (0,66) е.о.п. (табл. 4).

Выявлена статистически значимая зависимость между стадией ВИЧ-инфекции и уровнем sFas в сыворотке крови ВИЧ-инфицированных взрослых. Чем выше стадия, тем частота выяв-

Таблица 4. Частота выявления sFas в сыворотке крови ВИЧ-инфицированных больных в зависимости от стадии ВИЧ-инфекции (классификация СДС 1993г)

Стадия ВИЧ-инфекции	Частота выявления повышенных значений sFAS, %	ОП образцов, е.о.п.		U-критерий Манна-Уитни, значение p
		25-75% процентиля	M(s)	
A1	0%	0,073-0,160	0,13 (0,044)	$P_{A1A2}=0,746$ $P_{A1A3}=0,109$ $P_{A1B1}=0,715$ $P_{A1B2}=0,273$ $P_{A1B3}<0,001$ $P_{A1C2}=0,037$ $P_{A1C3}<0,001$
A2	0%	0,043-0,126	0,109 (0,055)	$P_{A2A3}=0,07$ $P_{A2B1}=0,46$ $P_{A2B2}=0,146$ $P_{A2B3}<0,001$ $P_{A3C2}=0,037$ $P_{A2C3}<0,001$
A3	0%	0,136-0,267	0,242 (0,066)	$P_{A3B1}=0,41$ $P_{A3B2}=0,855$ $P_{A3B3}=0,113$ $P_{A3C2}=0,045$ $P_{A3C3}=0,030$
B1	0%	0,077-0,136	0,12 (0,045)	$P_{B1B2}=0,347$ $P_{B1B3}=0,025$ $P_{B1C2}=0,052$ $P_{B1C3}<0,001$
B2	42%	0,095-0,377	0,181 (0,363)	$P_{B2B3}=0,308$ $P_{B2C2}=0,121$ $P_{B2C3}=0,208$
B3	53%	0,177-0,804	0,343 (0,635)	$P_{B3C2}=0,138$ $P_{B3C3}=0,322$
C2	100%	0,674-1,501	1,088 (0,585)	$P_{C2C3}=0,343$
C3	60%	0,174-0,723	0,366 (0,66)	

ления высоких уровней sFas/Аро-антигена в сыворотке крови выше (Kruskal-Wallis test: $H(7, N=69) = 31,65614$ $p < 0,001$) (рис.4).

У ВИЧ-инфицированных детей на стадии В3 повышенные уровни sFas/Аро в сыворотке крови выявлены у 5(83%) из 6 больных, показатели ОП варьировали в пределах 0,085-2,375 е.о.п. и в среднем составили 1,0 (0,825) е.о.п. Показатели ОП sFas/Аро у ВИЧ-инфицированных детей на С3 стадии варьировали в пределах 0,197-1,505 е.о.п. и в среднем составили 0,834 (0,499), а частота выявления в данной

группе – 80% (4 пациента из 5). Повышенных уровней sFas в сыворотке крови ВИЧ-инфицированных детей на стадиях А1, А3, В2 не было выявлено (табл. 5).

Выявлена статистически значимая зависимость между стадией ВИЧ-инфекции и частотой выявления высоких уровней sFas в сыворотке крови ВИЧ-инфицированных детей. Чем выше стадия, тем частота выявления высоких уровней sFas/Аро в сыворотке крови выше (Kruskal-Wallis test: $H(4, N=22) = 15,83676$ $p = 0,0032$) (рис.5).

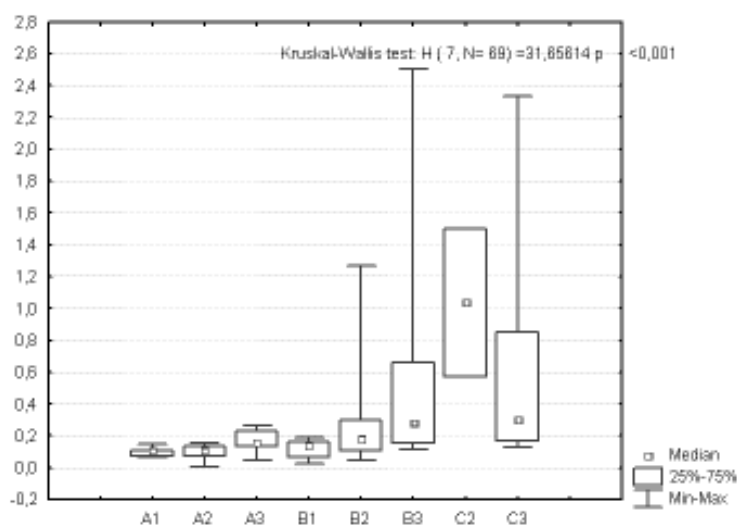


Рис. 4. Зависимость показателей ОП sFas/Аро (CD-95)-антигена от стадии ВИЧ инфекции у взрослых.

Таблица 5. Частота выявления sFas в сыворотке крови ВИЧ-инфицированных детей в зависимости от стадии ВИЧ-инфекции (классификация СДС 1994г)

Стадия ВИЧ-инфекции	Частота выявления повышенных значений sFAS, %	ОП образцов, е.о.п.		U-критерий Манна-Уитни, значение p
		25-75% процентиля	M(s)	
A1	0%	0,067-0,199	0,115 (0,078)	$p_{A1A2}=0,72$ $p_{A1B}=0,157$ $p_{A1B3}=0,025$ $p_{A1C3}=0,039$
A3	0%	0,083-0,241	0,162 (0,102)	$p_{A2B2}=0,083$ $p_{A2B3}=0,014$ $p_{A2C3}=0,010$
B2	0%	0,127-0,204	0,165 (0,044)	$p_{B2B3}=0,014$ $p_{B2C3}=0,033$
B3	83%	0,587-1,581	1,0 (0,825)	$p_{B3C3}=0,27$
C3	80%	0,513-1,038	0,834 (0,499)	

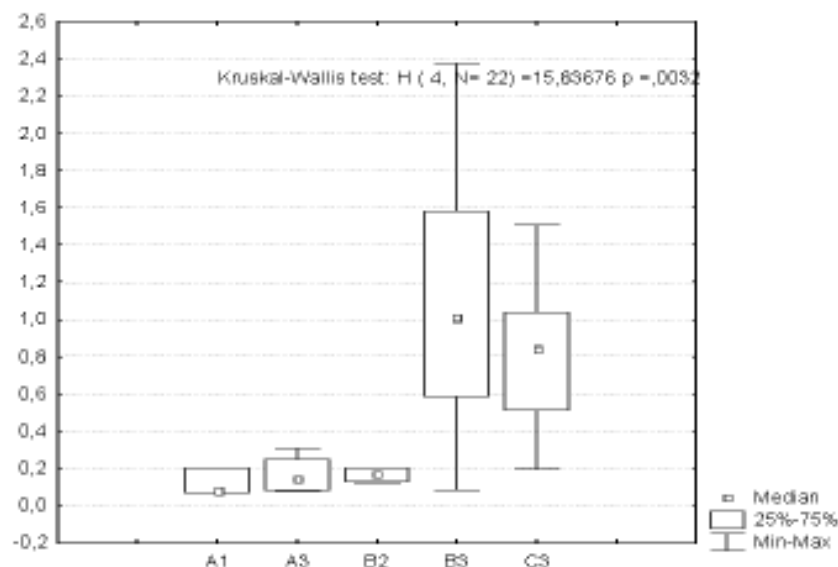


Рис. 5. Зависимость показателей ОП sFas/Apo (CD-95)-антигена от стадии ВИЧ инфекции у детей

Таким образом, повышенные уровни sFas/Apo (CD-95)-антигена выявляются чаще у ВИЧ-инфицированных больных на более поздних стадиях заболевания.

Повышенные уровни ОП sFas в пределах 0,509-2,830 е.о.п. были обнаружены в образцах сыворотки крови 6 (40%) больных вирусным гепатитом С на разных стадиях заболевания. Средний показатель ОП $1,387 \pm 0,865$ е.о.п. был статистически значимо выше соответствующего показателя в контрольной группе (Mann-Whitney U Test, $p < 0,001$).

Выводы

1. Созданный иммуноферментный диагностический набор для качественного определения растворимого антигена Fas/Apo (CD95) в сыворотке крови, обладает высокой воспроизводимостью и диагностической значимостью.
2. Установлено, что частота выявления повышенного уровня sFas в сыворотке крови

ВИЧ-инфицированных больных статистически значимо выше, чем у практически здоровых людей (Mann-Whitney U Test, $p < 0,001$).

3. Выявлена статистически значимая зависимость между частотой выявления повышенных уровней sFas и возрастом ВИЧ-инфицированных пациентов. У ВИЧ-инфицированных детей повышенный уровень sFas/Apo (CD95) выявлялся значимо чаще, чем у взрослых (Mann-Whitney U Test, $p = 0,002$).
4. У пациентов на более поздних стадиях ВИЧ-инфекции, как у детей (Kruskal-Wallis test, $p = 0,003$), так и у взрослых (Kruskal-Wallis test, $p < 0,001$), повышенные уровни sFas в сыворотке крови выявлялись чаще.
5. Описанный иммуноферментный диагностический набор может найти широкое применение в клинической практике для прогнозирования неблагоприятного течения и исходов ВИЧ-инфекции и других заболеваний.

Литература

1. Pierre-Marie Roger, Ghislaine Bernard-Pomie Overexpression of Fas/CD95 and Fas-Induced Apoptosis in a Patient with Idiopathic CD4+ T Lymphocytopenia Clinical Infectious Diseases. 1999; Vol. 28, No. 5: 1012-1016.
2. Рыжов С.В., Новиков В.В. Молекулярные механизмы апоптотических процессов Российский биотерапевтический журнал 2002; №3, Том 1: 27-33.

3. Обушева М.Н., Аббасова С.Г. и соавт. Растворимый Fas-антиген (sFas) в сыворотке крови больных злокачественными и доброкачественными новообразованиями яичников. Клин. лаб. диагностика 1999; №9: 7-8
4. Худякова Н.Е., Иванова Н.И., Носов Н.Н., Новиков В.В. Сывороточный уровень олигомерной фракции растворимого антигена CD95 у ВИЧ-инфицированных лиц. Мате-

- риалы научно-практической конференции «Актуальные проблемы ВИЧ-инфекции». Астрахань, 2003: 82-84.
5. Gougeon M.-L., Piacentini A. M. New insights on the role of apoptosis and autophagy in HIV pathogenesis Apoptosis. Springer Science+Business Media 2009; 14:501-508
6. Вяльцева Ю.В., Березина Л.В. Апоптоз как маркер развития резистентности к антиретровирусным препаратам у ВИЧ-инфицированных детей. Педиатрия, акушерство та гінекологія. 2008; № 4(428): 134-135.
7. Полосухина Е.Р., Заботина Т.Н., Шишкин Ю.В. Получение и характеристика моноклональных антител ІСО-160, против антигена CD-95 (Fas/Apo-1), опосредующего апоптоз. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1998; Т. 125, N 6: 670-67/225.
8. Митрикова Л.Ц., Климова Е.А. и соавт. Fas-зависимый апоптоз и поражение печени. Медицинская помощь 2005; №1: 11-15.б.
9. Васильев Д.А., Барышников П.И., Новиков Б.В. Современные методы иммунодиагностики инфекционных болезней (радиоиммунологический анализ, иммуноферментный анализ.), Ульяновск, УГСХА. 1998 г., 38 с.
10. Wilson M. B., Nakane P. K. Immunofluorescence and related staining techniques. London. 1978: 215.
11. Вербов В.Н. Принципы твердофазного иммуноферментного анализа.- Твердофазный иммуноферментный анализ. Сборник научных трудов, Л., Изд. института им. Пастера, 1988: 160, с. 26.
12. Пивень Н.В., Новиков В.В., Лухверчик Л.Н. и соавт. Иммуноферментный анализ Fas-рецептора (CD-95) у лиц с патологией щитовидной железы. Иммунопатология, аллергология, инфектология 2001; № 3: 15-2.
13. Marcus E. et all. The CD95 Receptor: Apoptosis Revisited, Cell 129, May 4, 2007.
14. Худякова Н.Е., Мартынова Т.Г. и соавт. Разработка и апробация иммуноферментного метода определения растворимой формы молекул HLA-DR. Вестник Нижегородского университета им. Н. И. Лобачевского. Сер. Биология. 2001; Вып. 1(5): 191-194.
15. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: В 2т. Т.1. 2-е изд. Мн.: Беларусь, 2002: 495 с.

Сведения об авторах:

Жаворонок Сергей Владимирович
ГУ «Белорусская медицинская академия последиplomного образования»
профессор кафедры инфекционных болезней
Адрес: 220714, г. Минск, ул. П. Бровки, 3
E-mail, тел.: javoronok@belmapo.by, тел./ факс (+375 17) 290-98-43, 290-98-42, тел. моб. +37529-655-33-87.
Барышников Анатолий Юрьевич
профессор, директор Научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей РОНЦ РАМН им. Н.Н. Блохина.
Тел./факс: (495) 324-22-74
Москалева Наталья Васильевна
ГУ «Белорусская медицинская академия последиplomного образования».
аспирант кафедры клинической лабораторной диагностики.
Адрес: 220714, г. Минск, ул. П. Бровки, 3
E-mail, тел.: m-nata-v@mail.ru, тел. моб. +37529-381-51-56
Тумаш Оксана Леонидовна
УО «Гомельский государственный медицинский университет».
ассистент кафедры инфекционных болезней.
Адрес: г. Гомель, ул. Ланге, 5
E-mail, тел.: tumash_ox@mail.ru, тел. моб. +37529-303-10-24

Поступила 12.01.2012 г.