

І.Ф. Ільїнська¹, Т.В. Задворний²

МЕТОДИ ОЦІНКИ СИСТЕМИ ГАММА ІНТЕРФЕРОНУ ПРИ ТУБЕРКУЛЬОЗИ

¹ ДУ "Національний інститут фтизіатрії і пульмонології імені Ф.Г. Яновського Національної академії медичних наук України", м. Київ

² Київський національний університет імені Тараса Шевченка, м. Київ

На сьогодні загально визнаним є той факт, що гамма-інтерферон (γ -IFN) є одним з найважливіших цитокінів у протитуберкульозному захисті [2, 21, 57, 60]. В розвитку протитуберкульозного імунітету головна роль належить Т-лімфоцитам та клітинам моноцитарно-макрофагального ряду. Відомо, що при формуванні адаптивного імунітету γ -IFN необхідний для активації Т-клітин [21, 22, 26, 57]: він сприяє їх дозріванню, підвищує експресію ними рецепторів до IL-12, IL-18 і генів I та II класів головного комплексу гістосумісності (ГКГС), а також посилює функціонування цитотоксичних Т-клітин. γ -IFN виступає одним з регуляторів інтенсивності апоптозу імунокомпетентних клітин, нейтрофільних гранулоцитів та макрофагів (Мф), регулює баланс цитокінів у ході імунної відповіді, активує натуральні кілери (НК) та Мф після чого вони набувають спроможність знешкоджувати мікобактерії туберкульозу (МБТ) [2, 26, 33, 43, 57, 64].

До складу системи γ -IFN входять: сам γ -IFN, клітини-продуценти з його генами та репресорами, клітини-мішені з поверхневими рецепторами до цього цитокіну та тими ферментними системами, котрі активуються під дією комплексу γ -IFN з рецепторами після його утворення та інтерналізації [9, 13]. Синтез γ -IFN здійснюється багатьма типами клітин, котрі беруть участь в імунному захисті, але головними продуцентами виступають активовані Т-хелпери (CD4⁺-Т-Лф), натуральні кілери (НК-клітини) та цитотоксичні Т-лімфоцити (CD8⁺-Т-Лф), а також активовані Мф [14, 29, 30]. В організмі, інфікованому МБТ, продукція γ -IFN регулюється багатьма антигенами цього збудника, що має дуалістичне значення: з одного боку, під їхнім впливом відбувається специфічна індукція синтезу даного цитокіну [14, 29, 39], а з іншого, — включаються ті механізми, котрі дають можливість мікобактеріям уникати

імунологічного контролю за участі γ -IFN [31, 37, 41, 48, 50–53, 62].

Дослідження системи γ -IFN у хворих на туберкульоз (ТБ) проводиться як для здійснення специфічної діагностики — так звані інтерферонові тести — IFN-Gamma Release Assays (IGRAs або TIGRAs) [14, 23, 28, 32, 42, 59, 67, 68], так і задля виявлення її порушень з метою їх подальшої корекції [9, 11–13, 15, 16, 35], а також для наукових цілей.

При ТБ порушення в системі γ -IFN можуть проявлятися:

— по-перше, їх низьким рівнем [35, 44] або внаслідок зменшення вмісту клітин-продуцентів [15], або через послаблення синтезу ними цього цитокіну [8, 36], або через надмірне зв'язування його клітинними рецепторами, розчинними лігандами та інактивацію антитілами до γ -IFN;

— по-друге, зниженням експресії інтерферонових рецепторів на клітинах імунного захисту через їх злущування при інтоксикації та при апоптозі;

— і, нарешті, модифікацією цих рецепторів внаслідок впливу МБТ і мутацій [21, 48, 50, 63].

Тому при ТБ важливо оцінювати не якийсь окремий показник, а всю систему γ -IFN в цілому. Виявлення її порушень та їх подальша корекція сприяє підвищенню ефективності етіотропного лікування хворих на ТБ, зменшенню кількості бактеріовиділювачів (котрі є джерелом інфекції) та покращенню внаслідок цього епідеміологічної ситуації в країні.

При проведенні наукових досліджень крім імунологічних, широко використовуються молекулярно-генетичні та біохімічні методи.

Отже, комплексна оцінка системи γ -IFN у хворих на ТБ передбачає визначення рівня γ -IFN у сироватці крові [5, 11] та/або інших біологічних рідинах (плевральному ексудаті [1, 4], бронхо-альвеолярному змиві [24], видихуваному повітрі [16], тощо), оцінку *in vitro* його продукції клітинами-продуцентами [12], а також кількості клітин-продуцентів γ -IFN [23, 34, 40, 46, 47, 55] і щільності рецепторів до нього на різних типах клітин імунного захисту [45, 58, 61].

Для визначення рівня γ -IFN у сироватці та інших біологічних рідинах найбільш широко використовується імуно-ферментний аналіз (ІФА), рідше — імуноблотинг (вестерн-блот) [18], а в останній час, — і проточна цитометрія, зокрема BD™ Cytometric Bead Array (CBA) — цитометрія на бусинах [25, 27].

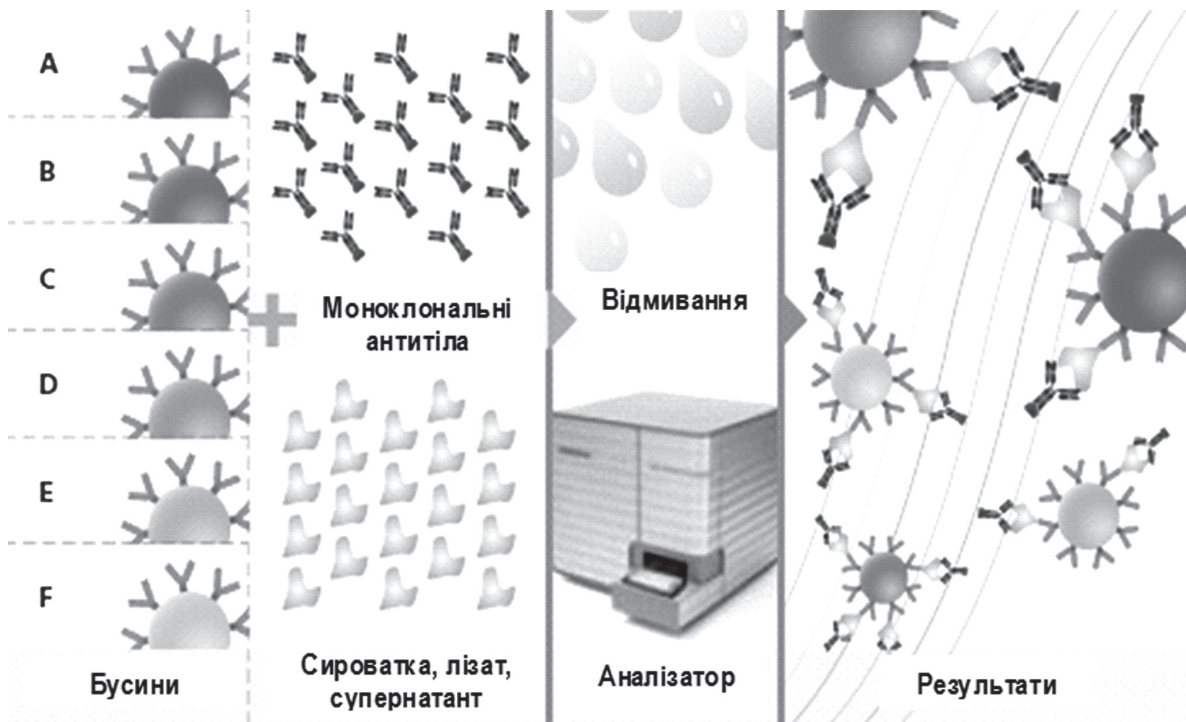


Рис. 1. Принцип проточної цитометрії на бусинах (CBA)

Ринок України має досить широкий діапазон комерційних тест-наборів для оцінки рівня g-IFN методом ІФА, котрі виробляються в Росії, Франції, Німеччині, Швеції, Швейцарії, США та інших країнах, і різняться чутливістю, точністю, зручністю використання й ціною. Це дозволяє кожній лабораторії зробити оптимальний вибір, орієнтуючись на власні потреби та можливості. Слід звернути увагу на те, що деякі тест-набори мають позначку “For research use only” (лише для дослідницьких цілей), тому для діагностики їх використовувати не слід. Також варто нагадати, що інтерферонам притаманна видоспецифічність, отже моноклональні антитіла (МКАТ) проти g-IFN людини непридатні для проведення експериментальних досліджень на тваринах.

BD™ Cytometric Bead Array (CBA), або цитометрія на бусинах (бісері), — це один із новітніх різновидів проточної цитометрії [25, 27]. Він дозволяє визначати рівень як одного (сімплексний аналіз), так і декількох білків одночасно (мультиплексний аналіз) і заснований на використанні вкритих МКАТ бусинок різних типів з власною унікальною інтенсивністю флуоресценції. Це дозволяє змішувати різні типи бусинок, що забезпечує широкий динамічний діапазон флуоресценції під час проточної цитометрії й дає можливість значно зменшити вимоги до проведення тесту та час на оцінку його результатів у порівнянні з

традиційним ІФА та вестерн-блотом. Крім того це дає змогу в одному зразку (50 мкл) визначати до 20 аналітів одночасно [27] (рис. 1).

Так, BD™ CBA Kits пропонує реактиви, які містять вже попередньо сконфігуровані групи для кінцевого використання, що забезпечують мультиплексний аналіз складних біологічних зразків на проточному цитофлуориметрі для визначення до 11 цитокінів одночасно, використовуючи при цьому бусинки з червоним барвником. Унікальні спектральні властивості цього барвника дозволяють проводити аналіз на лазерному цитометрі з довжиною хвилі 488 нм або на цитометрі з подвійним лазером (488 нм та 633 нм). Bender Medsystems теж випускає тест-набори для одночасного визначення проточною цитометрією 11 цитокінів (g-IFN, IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF-a, TNF-b) при їх мінімальній концентрації у зразках від 10 пг/мл. Система мультиплексного аналізу FlowCytomix™ (Bioscience) дозволяє визначити рівень g-IFN при його мінімальній концентрації у зразках 1,6 пг/мл і в присутності ще 19 інших цитокінів. Також існують набори з надзвичайно високою чутливістю (BD CBA Enhanced Sensitivity Flex Sets), котрі здатні визначати цитокіни в дуже малих концентраціях — від 0,274 пг/мл [54]. Сама постановка методики дуже проста та нагадує ІФА (рис. 1).

Проте вартість таких реактивів дуже висока¹, для їх застосування необхідні проточні цитометри, або спеціальний рідер (рис. 1). Крім того, в Україні ці тест-набори для діагностики не ліцензовані. Тому нині перспектива впровадження СВА в широку клінічну практику нашої держави сумнівна, а її використання для наукових цілей можливе лише за умови отримання грантів або іншої спонсорської допомоги.

Оцінку продукції γ -IFN проводять як у цільній крові (в одну пробу беруть від 200 мкл [10] до 1000 мкл [6]), так і у супернатантах культур мононуклеарів, виділених на градієнті щільності фікол-верографіну [12.]. В деяких дослідженнях мононуклеари попередньо звільняють від моноцитів шляхом адгезії цих клітин до пластику [39].

Розрізняють спонтанну продукцію γ -IFN і стимульовану: — фітогемаглютиніном або іншими Т-клітинними мітогенами (неспецифічну) та специфічну, де для стимуляції використовуються специфічні антигенні сполуки — цілі МБТ, їх лізати, сонікати, туберкулін і/або окремі антигени цього збудника (в.т.ч. рекомбінантні). Останнє в багатьох країнах світу широко використовують для імунодіагностики ТБ *in vitro*.

Так в Австралії наприкінці 1990-х років було розроблено та запатентовано так званий квантиферон-тест (QuantiFERON-TB). Він заснований на виявленні *in vitro* генерації та секреції сенсибілізованими Т-лімфоцитами γ -IFN у відповідь на специфічні антигени МБТ, рівень якого вимірюється за допомогою ІФА. Рекомбінантні антигени МБТ, котрі використовуються в даному тесті, являють собою суміш протеїнів ESAT-6, CFP-10 і TB7.7(p4).

ESAT-6 — ранній секреторний антиген з молекулярною масою 6 кД, CFP-10 — це пептид культурального фільтрату з молекулярною масою 10 кД, обидва вони кодується локусом RD 1, антиген TB7.7(p4) кодується локусом RD 11 [66]. Ці сполуки відносяться до парціальних імуно-

¹ Хоча, якщо порівняти загальну вартість комерційних тест-наборів, при визначенні кожного з них методом ІФА, вона виявиться значно більшою.

1. ЗАБОР КРОВІ ТА ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ



2. ВИЗНАЧЕННЯ РІВНЯ ГАММА-ІНТЕРФЕРОНУ ІФА

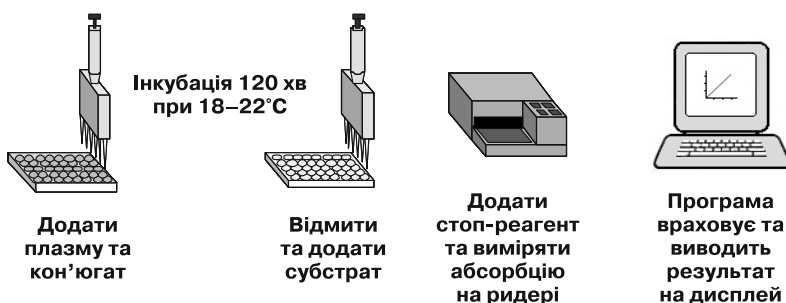


Рис. 2. Визначення антигенстимульованої продукції γ -інтерферону в цільній крові при туберкульозі

домінантних антигенів, які присутні в усіх традиційних туберкулінах, фільтратах культур МБТ людського та бичачого типу і деяких нетуберкульозних мікобактерій, зокрема *M. kansasii*, *M. szulgai* і *M. marinum*. Проте вони відсутні в усіх штаммах BCG, котрі під час атенуації втратили весь блок RD1 генів.

Технологія QuantiFERON, є дуже простою і тому добре підходить для діагностики багатьох захворювань інфекційного генезу (і в тому числі ТБ), а також для проведення клінічних досліджень та клінічних випробувань нових вакцин та інших медико-біологічних препаратів. А випуск готових пробірок для забору зразків крові, які містять усі необхідні компоненти (антикоагулянти, ліофілізовані поживні середовища, неспецифічний стимулятор Т-клітин — мітоген фітогемаглютинін та суміш специфічних антигенів МБТ — ESAT-6, CFP-10 та TB7.7(p4), значно спрощують постановку методики. Тест проводиться у 2 етапи (рис. 2):

— спочатку венозну кров збирають у 3 пробірки: контрольну, з мітогеном (ФГА) та антигенами МБТ, після чого зразки ретельно перемішують та здійснюють їхню інкубацію при 37°C у вологій атмосфері з 5% вмістом CO₂ у CO₂-інкубаторі. протягом 16–24 год. По звершенні інкубації пробірки центрифугують та відбирають плазму (супернатант) і визначають вміст у ній γ -IFN за допомогою ІФА. Нульова проба охоплює корек-

цію неспецифічних фонових реакцій, ефектів гетерофільних антитіл, а також неспецифічного γ -IFN в пробі крові. Значення вмісту γ -IFN нульової проби віднімається від значення вмісту гамма-інтерферону проби з антигенами МБТ та проби з мітогеном.

В осіб, не вакцинованих БЦЖ, специфічність даного тесту сягає 99,8%. у вакцинованих 98,1% — при чутливості 91,3%. У дітей та пацієнтів з імунodefіцитами різного генезу (в т.ч. ВІЛ/СНІДом) та негативними шкірними туберкуліновими пробами ці показники не перевищують 21–30% [32], що обмежує їх використання у представників вищезазначених контингентів.

Групою російських вчених було запропоновано схожий тест, котрий також передбачає визначення спонтанної та антигенстимульованої продукції γ -IFN мононуклеарами цільної крові, але для стимуляції використовують туберкулін (PPD) та суміш двох рекомбінантних антигенів МБТ — ESAT-6 і CFP-10, крім того, додавання будь-яких додаткових поживних речовин ця методика не передбачає, як і постановку проби з Т-клітинним мітогеном. Останнє, з нашої точки зору, є недоліком, тому що при хибно-негативних результатах через Т-клітинну імносупресію виявити її одразу неможливо, і для цього потрібно проводити додаткові дослідження.

За твердженнями розробників, діагностичний рівень продукції γ -IFN в зразках з ESAT-6 та

CFP-10 складає 70 пг/мл, а чутливість даного тесту при виявленні первинного інфікування МБТ у дітей дорівнює 97,8% при 94,4% специфічності [6, 14]. При виявленні індукції γ -IFN в пробах з PPD та її відсутності в пробах з рекомбінантними антигенами МБТ діагностується поствакцинальна алергія.

З огляду на те, що ці тести малопридатні для діагностики ТБ при його маніфестації та прогресуванні через високий відсоток хибно-негативних результатів внаслідок мононуклеарної імносупресії [42], у хворих на ТБ продукцію γ -IFN нерідко визначають з метою виявлення її дефектів. Для цього рівень γ -IFN найчастіше визначають у супернатантах, отриманих після інкубації свіжовиділених мононуклеарів крові у повному поживному середовищі з додаванням фетальної телячої сироватки, антибіотиків та НЕРЕС. Як правило, специфічну індукцію синтезу γ -IFN здійснюють додаванням туберкуліну [7], БЦЖ [12], лізатів МБТ та/або окремих антигенів цього патогену чи їх суміші [38, 39]. Доза антигенів у різних роботах коливається від 2,5 до 25 мкг/мл (найчастіше — 10 мкг/мл у перерахунку на білок). Здебільшого інкубацію здійснюють протягом 16–24 годин, але у деяких дослідженнях її тривалість більша — до 5 діб [38].

Визначення вмісту клітин-продуцентів γ -IFN також проводиться як у цільній крові, так і в суспензії мононуклеарів, отриманої після розді-

Таблиця 1

Переваги та недоліки специфічної імунодіагностики туберкульозу *in vitro* за допомогою тестів, заснованих на визначення продукції γ -інтерферону мононуклеарами периферичної крові

Переваги	Недоліки
Висока специфічність та чутливість	Відсутність державної реєстрації
Використання стандартних антигенів та реактивів	Відсутність вітчизняного досвіду їх використання
Зручність у використанні	Немає протоколів, затверджених МОЗ
Суперстерильність не потрібна	Не визначенні показання та протипоказання (обмеження) їх проведення
Автоматизація обліку результатів	Немає підготовленого персоналу
Не потребує повторних візитів пацієнтів	Висока вартість
Не викликає у них негативних реакцій	Відсутність прямих поставок фірм-виробників, що змушує звертатися до посередників, через що вартість наборів зростає ще більше
Швидке отримання результату — через добу	Наявність хибно-негативних результатів тестів у хворих на ТБ з імунodefіцитами будь-якого генезу (крім CLINISPOT-TB)
Можна використовувати багаторазово для здійснення моніторингу як одного пацієнта, так і групи осіб	
Дозволяє накопичувати матеріал, що дуже зручно при проведенні наукових досліджень	
Прийняті в усьому світі	
Деякі реактиви можна замінити дешевшими	Наявність хибно-позитивних результатів тестів у вакцинованих та осіб з латентною туберкульозною інфекцією
Можна використовувати те обладнання, яке є у лабораторіях	

лення лейкоцитів на градієнті щільності фікол-верографіну. Найчастіше користуються технікою ELISPOT (enzyme-linked immunospot assays) або проточною цитометрією.

Тест CLINISPOT-TB заснований на модифікації методології ELISPOT. Його разом з Quanti FERON-TB нині вважають “золотим стандартом” імунодіагностики ТБ *in vitro*. Їх переваги та недоліки представлені в табл. 1. Принцип цього тесту схожий на квантифероновий, але він заснований на детекції клітин, що містять внутрішньоклітинний γ -IFN, котрий накопичується в них після антигенспецифічної стимуляції сумішшю рекомбінантних антигенів МБТ ESAT-6 та CFP-10. Для утримання γ -IFN в середині клітин використовують брефелдін А, блокатор транспорту протеїнів з апарату Гольджи (що унеможливує їх секрецію), а щоби мічені МКАТ проти γ -IFN та субстрат змогли пройти крізь клітинні мембрани здійснюють їх пермеабілізацію розчином, що містить ТВІН-20 [40, 49].

CLINISPOT-TB також проводиться у декілька етапів:

– спочатку з гепиринізованої крові виділяють мононуклеари за стандартною технікою, підраховують їх концентрацію та доводять її до робочої — 1–2 млн/мл;

– на другому етапі клітини вносять у лунки 96-лункового планшету, після чого додають розчин з антигенами МБТ та інкубують протягом ночі;

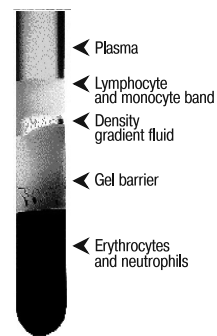
– на третьому етапі планшет відмивають, додають реагент і експонують протягом 60 хвилин. Після чергової відмивки планшету в лунки вносять субстрат: кольорові плями з’являються через 7 хвилин. Знову відмивають планшет і висушують його (рис. 3);

– четвертим етапом є підрахунок кольорових плям, що утворилися. Цю процедуру можна виконувати вручну, використовуючи лупу чи мікроскоп, або автоматично, за допомогою спеціального обладнання — ELISPOT READER (рис. 3).

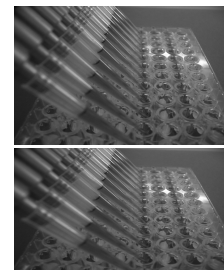
В мультицентрових клінічних дослідженнях було продемонстровано, що чутливість тесту CLINISPOT-TB при активному ТБ сягає 81%



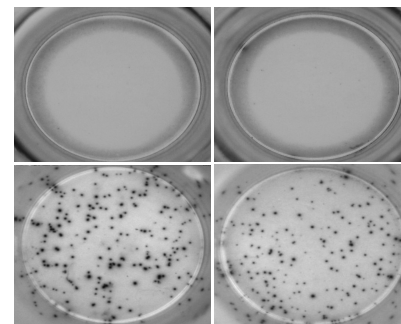
- ✓ Забор крові
- ✓ Центрифугування проб
- ✓ Відбір мононуклеарного кільця
- ✓ Відмивання клітин, їх підрахунок та доведення до робочої концентрації



- ✓ Клітини вносять в лунки 96-лункового планшету
- ✓ Вносять в лунки розчин з антигенами МБТ
- ✓ Планшет інкубують протягом ночі



- ✓ Відмивання планшету
- ✓ Внесення в лунку реагенту та експозиція 60 хв
- ✓ Відмивання планшету
- ✓ Внесення субстрату → плями утворюються через 7 хв
- ✓ Планшет відмивають та висушують



- ✓ Плями підраховують, використовуючи лупу, мікроскоп чи автоматичний Elispot reader



Рис. 3. Схема проведення тесту CLINISPOT-TB

навіть у пацієнтів з позалегеновою локалізацією процесу, а у високо розвинутих країнах — 90%. Деякі автори вважають, що навіть при латентному ТБ та у імунокомпроментованих пацієнтів цей метод не втрачає своєї діагностичної цінності за рахунок виявлення окремих сенсibiliзованих клітин. Проте існують й інші повідомлення, в котрих доцільність застосування методу CLINISPOT-TB для діагностики ТБ у імунокомпроментованих пацієнтів ставиться під сумнів [49].

Метод внутрішньоклітинного фарбування цитокінів флуорохромами — intracellular cytokine staining (ICS), також відомий як “cytokine flow cytometry” (“проточна цитометрія цитокінів”), в поєднанні з антиген-специфічною стимуляцією

T-клітин широко застосовується тоді, коли потрібно проводити багато-параметричний аналіз в одному зразку, наприклад, паралельно визначати клітини-продуценти інших цитоінів, або визначати вміст продуцентів γ -IFN серед окремих субпопуляцій T-клітин, в т.ч. мінорних, для чого потрібно одночасно оцінювати наявність тих чи тих CD-маркерів та клітинних рецепторів [34, 40, 47, 55, 56].

Принциповими відмінностями даної технології від CLINISPOT-TV є те, що в даному тесті можливо використовувати як культуру мононуклеарів, так і цільну гепаринізовану кров (а це економить і час, необхідний для постановки методики, і реактиви). Крім того, після індукції синтезу мононуклеарами γ -IFN, яку здійснюють за присутності брэфелдіну А, клітини відмивають, потім інкубують з міченими різними флуорохромами МКАТ до поверхневих маркерів (наприклад, анти-CD4 та/або анти-CD8 для детекції T-хелперів та цитотоксичних T-лімфоцитів), і лише потім, після чергового відмивання, проводять пермеабілізацію за допомогою 0,2% розчину Твін-20 та здійснюють інкубацію з моноклональними анти- γ -IFN-антитілами, котрі також кон'юговані з флуорохромом, котрий має флуоресценцію, відмінну від попередніх. Перед проведенням проточної цитометрії для обліку всіх клітин, в т.ч. адгерентних, їх обробляють розчином для лізису еритроцитів з певним вмістом ЕДТА. В залежності від кількості МКАТ, мічених різними флуорохромами (тобто від кількості тих параметрів, котрі визначаються одночасно в одному зразку) розрізняють дво-, три-, чотирьох-, п'яти- та полі-(понад 5)-кольорову цитометрію [34, 40, 47, 55]. Звичайно, що вартість і реактивів, і обладнання для проведення таких тестів дуже висока.

Нещодавно з'явилася модифікація тесту ELISPOT — FluoroSpot. Так, якщо в ELISPOT за допомогою додавання мічених анти-цитокінових

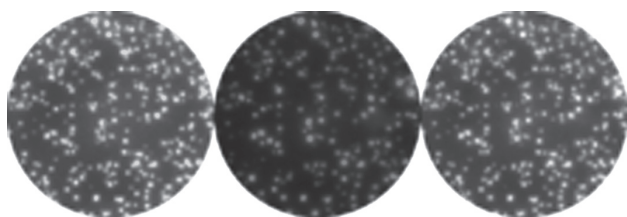


Рис. 4. Результати визначення вмісту клітин, що секретують γ -IFN та IL-2, за допомогою технології FluoroSpot, де зелене забарвлення набувають клітини, що продукують γ -IFN, червоне — IL-2, жовте — обидва цитокини

антитіл звичайно визначаються клітини, котрі секретують один тип цитокіну, проведення FluoroSpot завдяки використанню різних антицитокінових флуоресцентних МКАТ дає можливість в одному зразку виявляти клітини, котрі секретують декілька цитокінів. Цей метод доречно застосовувати для вивчення продукції 2–3 цитокінів однією клітиною, особливо при тих ситуаціях, коли таких клітин дуже мало (наприклад, при дослідженні субпопуляції поліфункціональних T-Лф) [17].

Чутливість тесту FluoroSpot така ж сама, як традиційного ELISPOTу, а його проведення просте у виконанні й підходить як для індивідуального тестування, так і для великих скринінгових досліджень. Принцип і порядок FluoroSpot схожий на ELISPOT. Але аналіз результатів передбачає облік клітин, що секретують один цитокин (їх мембрани набуватимуть відповідне забарвлення — червоне при використанні МКАТ, мічених фікоеритрином або зелене — при використанні МКАТ, мічених FITC), а також клітин, котрі секретують обидва цитокини (при накладанні один на одного ці кольори будуть давати жовтий колір (рис. 4). Для здійснення такого аналізу зразків в автоматичному режимі також пропонується спеціальний рідер.

При визначенні порушень продукції γ -IFN та вивченні їх механізмів може проводитися оцінка експресії його генів, для чого використовуються молекулярно-генетичні методи досліджень, зокрема активність їх мРНК з використанням методів зворотної транскрипції та полімеразноланцюгової реакції (ПЛР). Полімеразноланцюгова реакція в режимі реального часу (ПЛР-РРЧ) — це комплекс методик проведення кількісної ПЛР з визначенням виходу продукту реакції (γ -IFN) після кожного циклу ампліфікації й розрахунком відносної його концентрації на основі аналізу кінетичної кривої ПЛР. Перевагами ПЛР-РРЧ є можливість використовувати невеликі клінічні зразки, висока чутливість методу, відсутність необхідності проведення електрофорезу та можливість кількісної оцінки експресії гену з високою точністю [3]. Генотипування використовується для вивчення поліморфізму генів γ -IFN в тих чи інших популяціях, виявлення їх мутацій та з'ясування значення останніх в збільшенні уразливості до ТБ [19, 20, 65]. Але ці дослідження звичайно здійснюються молекулярно-біологічними та генетичними лабораторіями, тому в даній роботі детально зупинятися на них не варто.

Визначення рецепторів до g-IFN на клітинах при ТБ проводять з метою оцінки їх щільності на різних популяціях і субпопуляціях клітин та вмісту клітин, котрі мають такі рецептори, також вивчають поліморфізм та мутації у генах, що їх кодують [45, 58, 61]. Для оцінки щільності рецепторів до γ -IFN використовують анти-CD 119 МКАТ (GIR-antibody), мічених флуорохромами, з наступним обліком результатів або на проточному цитометрі, або на флуоресцентному мікроскопі. Ці МКАТ розпізнають позаклітинну область α -ланцюга (глікопротеїну 80–95 kDa) субодиниці рецептору до γ -IFN.

Відомо, що у людини функціонально активна форма рецептору до γ -IFN складається з двох чи більше субодиниць, які представлені α -ланцюгом (IFN- γ R α), котрий зв'язує γ -IFN і β -ланцюгом, відповідальним разом з IFN- γ R α за транспортування в середину клітини комплексу, що утворився, та трансдукцію біологічних реакцій. IFN- γ R α (CD119) експресується на поверхні більшості клітин людини (за виключенням зрілих еритроцитів): на моноцитах, макрофагах, Т-лімфоцитах, В-клітинах, натуральних кілерах, нейтрофілах, фібробластах, епітеліальних клітинах та ендотелії. Анти-CD119 МКАТ не здатні зв'язуватися з рецепторами до γ -IFN інших видів, а лише з людськими, тому що при створенні гібридом як імуноген було взято очищений IFN- γ R α плаценти людини.

Анти-CD119 МКАТ, які випускаються різними фірмами, можуть являти собою нейтралізуючі антитіла, котрі конкурують з γ -IFN при зв'язуванні з рецептором (наприклад, GIR-208). На це треба звертати увагу, тому що в зразках зі значною присутністю розчиненого ліганду IFN- γ R α цитометрія може хибно показати занижену експресію рецепторів клітинами, а високий рівень нативного чи рекомбінантного γ -IFN (200 нг/мл і вище) повністю інактивує ці МКАТ (зокрема при їх використанні в дозі 0,06 мг/10⁶ клітин і нижче) і теж дає занижені результати. У таких випадках можна використовувати анти-CD119 МКАТ, котрі не є нейтралізуючими (наприклад, GIR-94). Крім того, перед проведенням тестування великої кількості зразків рекомендується попередньо підібрати оптимальне співвідношення клітин та МКАТ, котрі беруться для аналізу.

При виявленні реального пригнічення експресії рецепторів до γ -IFN мононуклеарними клітинами хворих на ТБ призначати їм препарати

рекомбінантного g-IFN або його індукторів не має сенсу.

Таким чином, оцінка стану системи γ -інтерферону при ТБ має бути комплексною та ретельно спланованою, що забезпечить як ефективність проведення інтерферонотерапії хворим на цю недугу, так і прогрес наукових досліджень.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гамма-інтерферон и аденозиндезаминаза в диагностике туберкулезного плеврита / М.Е. Дьякова, О.Т. Титаренко, Т.Л. Перова // Пробл. туберкулеза. — 2004. — № 12. — С. 27–29.
2. Дисфункции макрофагов, генерированных из моноцитов больных туберкулезом легких / Л.В. Сахно, М.А. Тихонова, С.Д. Никонов [и др.] // Бюл. СО РАМН. — 2010. — № 2. — С. 101–108.
3. Захарова М.В. Нарушения цитокинового профиля больных впервые выявленным инфильтративным туберкулезом легких [Электронный документ] / М.В. Захарова, О.И. Капунина, М.В. Мезенцева, В.А. Стаханов. — Режим доступа: <http://medsocium.com/narusheniya-tsitokinovogo-profilya-bolnykh-vpervye-vyyavlennym-infiltrativnym-tuberkulezom-legkikh.h>
4. Значение определения интерферона-гамма в диагностике туберкулезного экссудативного плеврита / С.Д. Даренская, Н.В. Макарова, М.А. Владимирский и др. // Пробл. туберкулеза. — 2008. — № 2. — С. 29–32.
5. Иммуный статус больных с впервые выявленным инфильтративным туберкулезом легких, страдающих частой респираторной вирусной инфекцией / Ю.Г. Суховой, С.А. Петров, А.В. Попов [и др.] // Пробл. туберкулеза. — 2004. — № 11. — С. 28–31.
6. Количественный анализ индукции γ -интерферона клетками цельной крови *in vitro* в присутствии антигенов микобактерий туберкулеза / Л.И. Мордовская, В.А. Аксенова, М.А. Владимирский [и др.] // Педиатрия. — 2009. — Т. 88, № 5. — С. 43–46.
7. Особенности специфического иммунного ответа у отдельных больных фиброзно-кавернозным туберкулезом легких / А.В. Елькин, Б.Е. Кноринг, И.С. Фрейндлин [и др.] // Мед. иммунология. — 2006. — № 4. — С. 501–510.
8. Пролиферативный и секреторный ответ мононуклеарных лейкоцитов на комбинированное воздействие этамбутола и микобактериального антигена / О.А. Васильева, В.В. Новицкий, А.К. Стрелис [и др.] // Мед. иммунология. — 2009. — № 2. — С. 153–160.
9. Рафальский В.В. Клиническое применение препаратов интерферона. — М., 2000. — С. 5–15.
10. Рябова, Л. В. Местные и системные иммунные механизмы хронического воспаления у больных бронхиальной астмой легкой степени тяжести [Текст] / Л. В. Рябова, А. В. Зурочка, В. В. Хайдуков // Мед. иммунология. — 2009. — № 2–3. — С. 169–176.
11. Салина Т.Ю. Интерферон-гамма и IgG антитела к M. tuberculosis в сыворотке крови больных активным туберкулезом легких / Т. Ю. Салина, Т. И. Морозова // Пробл. туберкулеза и болезней легких. — 2004. — № 11. — С. 43–45.]
12. Салина Т. Ю. Продукция интерферона γ мононуклеарными клетками крови больных при разных типах течения туберкулезного процесса / Т.Ю. Салина, Т.И. Морозова // Пробл. туберкулеза и болезней легких. — 2004. — № 10. — С. 19–21.
13. Сологуб Т.В. Гамма интерферон: обоснование и перс-

- пективы применения в инфекционной практике / Т.В. Соколуб // СПб.: Медлайн Эксперсс, 2006. — № 2–3. — С. 21–23.
14. Современный подход к иммунологической диагностике туберкулезной инфекции у детей и подростков / Л.И. Мордовская, М.А. Владимирский, В.А. Аксенова, Ф.А. Захарова // Дальневосточный мед. журн. — 2009. — № 4. — С. 37–39.
 15. Уровень CD3⁺-лимфоцитов, содержащих интерферон-гамма, у больных туберкулезом легких и его изменение после включения в комплексную терапию полиоксидония / Б.В. Пинегин, В.Ю. Мишин, Е.В. Костенко [и др.] // Иммунология. — 2004. — № 4. — С. 210–213.
 16. Шаповалов В.П. Влияние препарата “протектазид” (группа рутину) на концентрацию цитокинов у криоконсервантованому експирату вперше діагностованих хворрих на деструктивний туберкульоз легень в ексудативній фазі специфічного запалення / В.П. Шаповалов // Клініч. та експерим. патологія. — 2006. — Т.5, № 1. — С. 92–95.
 17. A Fluorospot assay to detect single T lymphocytes simultaneously producing multiple cytokines / A. Gazagne [et al.] // J. Immunol. Methods. — 2003. — Vol. 283, № 1–2. — P. 91–98.
 18. Alegria-Schaffer A. Performing and optimizing Western blots with an emphasis on chemiluminescent detection / A. Alegria-Schaffer, A. Lodge, K. Vattem // Methods Enzymol. — 2009. — Vol. 463. — P. 573–599.
 19. Amim Lucia H.L.V. Role of IFN- γ +874 T/A single nucleotide polymorphism in the tuberculosis outcome among Brazilians subjects / Lucia H.L.V. Amim, Antonio G. Pacheco, Joseane Fonseca-Costa // Molecular Biology Reports. — 2008. — Vol. 35, № 4. — P. 563–566.
 20. Analysis of eight genes modulating interferon gamma and human genetic susceptibility to tuberculosis: a case-control association study / M. Möller, A. Nebel, P.D van Helden [et al.] // BMC Infectious Diseases. — 2010. — Vol. 10, № 1. — P. 154–161.
 21. Barnes P.F. Type 1 cytokines and the pathogenesis of tuberculosis / P.F. Barnes, B. Witzel // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. — 2000. — Vol. 161, № 6. — P. 1773–1774.
 22. Bellamy R. Interferon- γ and Host Susceptibility to Tuberculosis / R. Bellamy // American journal of respiratory and critical care medicine. — 2003. — Vol. 167. — P. 946–947.
 23. Comparison of Two Commercially Available Gamma Interferon Blood Tests for Immunodiagnosis of Tuberculosis / Dominguez Jose, Juan Ruiz-Manzano, Malu De Souza-Galvao // Clin Vaccine Immunol. — 2008. — Vol. 15, № 1. — P. 168–171.
 24. Compartmentalized bronchoalveolar IFN- γ and IL-12 response in human pulmonary tuberculosis / M. T. Herrera, M. Torres, D. Nevels [et al.] // Tuberculosis. — 2009. — Vol. 89, № 1 — P. 38–47.
 25. de Jager W. Solid-phase and bead-based cytokine immunoassay: a comparison / W. de Jager, G.T. Rijkers // Methods. — 2006. — Vol. 38, № 4. — P. 294–303.
 26. Desvignes L. Interferon-gamma responsive nonhematopoietic cells regulate the immune response to Mycobacterium tuberculosis / L. Desvignes, J.D. Ernst // Immunity. — 2009. — Vol. 31. — P. 974–985.
 27. Elshal M.F. Multiplex Bead Array Assays: Performance Evaluation and Comparison of Sensitivity to ELISA / M.F. Elshal, Philip McCoy // Methods. — 2006. — Vol. 38, № 4. — P. 317–323.
 28. Evaluation of the diagnostic utility of a whole-blood interferon-gamma assay for determining the risk of exposure to Mycobacterium tuberculosis in Bacille Calmette-Guerin (BCG)-vaccinated individuals / S.Y. Eum, V.J. Lee, H.K. Kwak, J.H. Min [et al.] // Tuberculosis. — 2008. — Vol. 88, № 1. — P. 31–38.
 29. Gamma Interferon-Based Immunodiagnosis of Tuberculosis: Comparison between Whole-Blood and Enzyme-Linked Immunospot Methods / E. Schölvinck, K.A. Wilkinson, A.O. Whelan [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. — 2004. — Vol. 42, № 2. — P. 829–831.
 30. Gamma interferon expression in CD8⁺ T cells is a marker for circulating cytotoxic T lymphocytes that recognize an HLA A2-restricted epitope of human cytomegalovirus phosphoprotein pp65 / S.A. Ghanekar, L.E. Nomura, M.A. Suni [et al.] // Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. — 2001. — № 8. — P. 628–631.
 31. Gehring A.J. The Mycobacterium tuberculosis 19-kilodalton lipoprotein inhibits gamma interferon-regulated HLA-DR and Fc γ R1 on human macrophages through Toll-like receptor 2 / A.J. Gehring // Infect. Immun. — 2003. — Vol. 71. — P. 4487–4497.
 32. Guidelines for Using the QuantiFERON[®]-TB Gold Test for Detecting Mycobacterium tuberculosis Infection [Electr. Document] // United States, Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR), Recommendations and Reports — 2005. — № 54 (RR15). — P. 5449–5455. — Режим документа: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5415a4.htm>.
 33. Hernandez-Pando R. Factors that deregulate the protective immune response in tuberculosis / R. Hernandez-Pando, H. Orozco, D. Aguilar // Arch. Immunol. Ther. Exp. — 2009. — Vol. 57. — P. 355–367.
 34. Fuhrmann S. How flow cytometry is changing the study of TB immunology and clinical diagnosis / S. Fuhrmann, M. Streitz, F. Kern // Cytometry Part A. — 2008. — Vol. 73, Part A. — P. 1100–1106.
 35. Immune markers measured before treatment predict outcome of intensive phase tuberculosis therapy / S. Brahmhatt, G.F. Black, N.M. Carroll [et al.] // Clin. Rsp. Immunol. — 2006. — Vol. 146, № 2. — P. 243–252.
 36. Inhibition of IFN-gamma induced class II transactivator expression by a 19-kDa lipoprotein from Mycobacterium tuberculosis: a potential mechanism for immune evasion / R.K. Pai, M. Convery, T.A. Hamilton [et al.] // J. Immunol. — 2003. — Vol. 171. — P. 175–184.
 37. Innate inhibition of adaptive immunity: Mycobacterium tuberculosis-induced IL-6 inhibits macrophage responses to IFN- γ / V. Nagabhushanam, A. Solache, L.M. Ting [et al.] // Immunol. — 2003. — Vol. 171. — P. 4750–4757.
 38. Interferon gamma response to combinations 38 kDa/CFP-10, 38 kDa/MPT-64, ESAT-6/MPT-64 and ESAT-6/CFP-10, each related to a single recombinant protein of Mycobacterium tuberculosis in individuals from tuberculosis endemic areas / R.C. Tavares, J. Salgado, V.B. Moreira [et al.] // Microbiol. Immunol. — 2007. — Vol. 51, № 3. — P. 289–296.
 39. Interferon-Gamma Responses to Mycobacterial Antigens Protect Against Subsequent HIV-associated Tuberculosis / T. Lahey, S. Sheth, M. Matee // J Infect Dis. — 2010. — Vol. 202, № 8. — P. 1265–1272.
 40. Kern F. Measuring Ag-specific immune responses: understanding immuno-pathogenesis and improving diagnostics in infectious disease, autoimmunity and cancer / F. Kern, G. Li Pira, J.W. Gratama // Trends Immunol. — 2005. № 26. — P. 477–484.
 41. Kincaid E.Z. Mycobacterium tuberculosis exerts gene-selective inhibition of transcriptional responses to IFN- γ without inhibiting STAT1 function / E.Z. Kincaid, J.D. Ernst // J. Immunol. — 2003. — Vol. 171. — P. 2042–2049.
 42. Lardizabal A.A. Interferon-gamma Release Assay for Detection of Tuberculosis Infection / A.A. Lardizabal,

- L.B. Reichman // *US Respiratory Disease* –2006. — Issue II.
43. Lee J. Interferon- γ Regulates the Death of *M. tuberculosis*-Infected Macrophages / J. Lee, H. Kornfeld // *J. of Cell Death*. — 2010. — № 3. — P. 1–11.
 44. Level of interferon gamma in the blood of tuberculosis patients / S. Hussain, N. Afzal, K. Javaid [et al.] // *Iran J. Immunol.* — 2010. — Vol. 7, № 4. — P. 240–246.
 45. Linkage and association analysis of candidate genes for TB and TNF-alpha cytokine expression: evidence for association with IFNGR1, IL-10, and TNF receptor 1 genes / C.M. Stein, S. Zalwango, A.B. Chiunda [et al.] // *Hum. Genet.* — 2007. — № 121. — P. 663–673.
 46. Maino V.C. Identification of functional subsets by flow cytometry: intracellular detection of cytokine expression / V.C. Maino, L.J. Picker // *Cytometry*. — 1998. — Vol. 34. — P. 207–215
 47. Measurement of antigen specific immune responses: 2006 update / G. Li Pira, F. Kern, J.W. Gratama [et al.] // *Cytometry Part B*. — 2007. — №;72, part B. — P. 77–85.
 48. Modulation of Gamma Interferon Receptor 1 by *Mycobacterium tuberculosis*: a Potential Immune Response Evasive Mechanism / A. Singhal, A. Jaiswal, V.K. Arora, H.K. Prasad // *Infect. Immun.* — 2007. — Vol. 75, № 5. — P. 2500–2510.
 49. Mori T. Usefulness of interferon-gamma release assays for diagnosing TB infection and problems with these assays // *Journal of Infection and Chemotherapy*. — 2009. — Vol. 15, № 3. — P. 143–155.
 50. *Mycobacteria* inhibition of IFN- γ induced HLA-DR gene expression by up-regulating histone deacetylation at the promoter region in human THP-1 monocytic cells / Y. Wang, H.M. Curry, B.S. Zwilling, W.P. Lafuse // *J. Immunol.* — 2005. — Vol. 174. — P. 5687–5694.
 51. *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* inhibit IFN- γ -induced gene expression by TLR2-dependent and independent pathways / W.P. Lafuse, G.R. Alvarez, H.M. Curry, B.S. Zwilling // *J. Interferon Cytokine Res.* — 2006. — Vol. 26. — P. 548–561.
 52. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits macrophage responses to IFN γ through myeloid differentiation factor 88-dependent and -independent mechanisms / S.M. Fortune [et al.] // *J. Immunol.* — 2004. — Vol. 172. — P. 6272–6280.
 53. *Mycobacterium tuberculosis* 19-kDa lipoprotein inhibits IFN- γ -induced chromatin remodeling of MHC2TA by TLR2 and MAPK signaling / M.E. Pennini, R.K. Pai, D.C. Schultz [et al.] // *J. Immunol.* — 2006. — Vol. 176. — P. 4323–4330.
 54. New BD™ Cytometric Bead Array Flex Set System. The easiest way to multiplex with beads [электронный документ]. / w.a. — Режим доступа: http://www.bdj.co.jp/pdf/55-03_04-7900030-30-A1.pdf
 55. Nomura L.E. Optimization of whole blood antigen-specific cytokine assays for CD4+ T cells / L.E. Nomura, J.M. Walker, H.T. Maecker // *Cytometry*. — 2000. — Vol. 40. — P. 60–68.
 56. Nomura L. Standardization and optimization of multiparameter intracellular cytokine staining // L. Nomura, V.C. Maino, H.T. Maecker // *Cytometry Part A*. — 2008. — Vol. 73A. — P. 984–991.
 57. North R.J. Immunity to tuberculosis / R.J. North, Y.J. Jung // *Annu. Rev. Immunol.* — 2004. — № 22. — P. 599–623.
 58. Novel mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to myobacterial (sic) infections / M. Storgaard, K. Varming, T. Herlin, N. Obel // *Scand. J. Immunol.* — 2006. — № 64. — P. 137–139.
 59. Pai M. Interferon- γ assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review / M. Pai, L.W. Riley, J.M. Colford // *The Lancet Infectious Diseases*. — 2004. — Vol. 4, № 12. — P. 761–776.
 60. Philips J.A. Tuberculosis pathogenesis and immunity // J. A. Philips, J. D. Ernst // *Annual Review Pathology*. — 2011. — Vol. 7. — P. 353–384.
 61. Polymorphism within the interferon-gamma/receptor complex is associated with pulmonary tuberculosis / G.S. Cooke, S.J. Campbell, J. Sillah [et al.] // *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* — 2006. — № 174. — P. 339–343.
 62. Potent inhibition of macrophage responses to IFN-gamma by live virulent *Mycobacterium tuberculosis* is independent of mature mycobacterial lipoproteins but dependent on TLR2 / N. Banaiee, E.Z. Kincaid, U. Buchwald // *J. Immunol.* — 2006. — Vol. 176. — P. 3019–3027.
 63. Prolonged Toll-like receptor signaling by *Mycobacterium tuberculosis* and its 19-kilodalton lipoprotein inhibits gamma interferon-induced regulation of selected genes in macrophages / R.K. Pai [et al.] // *Infect. Immun.* — 2004. — № 72. — P. 6603–6614.
 64. Ray J. Christian J. The timing of TNF and IFN- γ signaling affects macrophage activation strategies during *Mycobacterium tuberculosis* infection / J. Christian J. Ray, Jian Wang John Chan, Denise E. Kirschner // *J. Theor. Biol.* — 2008. — Vol. 252, № 1. — P. 24–38.
 65. Role of IFN- γ +874 T/A single nucleotide polymorphism in the tuberculosis outcome among Brazilians subjects / Lucia H. L. V. Amim, Antonio G. Pacheco, Joseane Fonseca-Costa // *Molecular Biology Reports*. — 2008. — Vol. 35, № 4. — P. 563–566.
 66. Selected RD1 peptides for active tuberculosis diagnosis: comparison of a gamma interferon whole-blood enzyme-linked immunosorbent assay and an enzyme-linked immunosorbent assay / D. Goletti, D. Vincenti, S. Carrara [et al.] // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* — 2005. — № 12. — P. 1311–1316.
 67. Updated Guidelines for Using Interferon Gamma Release Assays to Detect *Mycobacterium tuberculosis* Infection, United States // *MMWR*, 2010. — № RR-5. — p. 59.
 68. Use in routine clinical practice of two commercial blood tests for diagnosis of infection with *Mycobacterium tuberculosis*: a prospective study / Giovanni Ferrara, Monica Losi [et al.] // *Lancet*. — 2006. — Vol. 367. — P. 1328–1334.

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ СИСТЕМЫ ГАММА-ИНТЕРФЕРОНА ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ

И.Ф. Ильинская, Т.В. Задворный

Представлена детальная характеристика тестов, которые используются для комплексной оценки системы гамма-интерферона при туберкулезе, и обсуждены их преимущества, недостатки и перспективы применения для иммунодиагностики и иммунокоррекции у больных с этим заболеванием.

ASSESSMENT METHODS OF GAMMA-INTERFERON SYSTEM AT TUBERCULOSIS

I.F. Ilyinskaya, T.V. Zadvorny

Detail characteristic of tests, used for complex evaluation of gamma-interferon system at tuberculosis, is present and their advantages, limitations and perspectives of application for immunodiagnosics and immunocorrection in patients with this pathology were discussed.