

УДК 616.24-002.5-036.17-053

## СОДЕРЖАНИЕ ВИТАМИН Д СВЯЗЫВАЮЩЕГО ПРОТЕИНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ, БОЛЬНЫХ РАЗЛИЧНЫМИ ФОРМАМИ ТУБЕРКУЛЕЗА ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ

**Авербах М.М. (мл.), Панова Л.В., Губкина М.Ф., Горелова Л.А., Карпина Н.Л.**  
*ФГБНУ «Центральный НИИ туберкулеза», Москва, e-mail: amm50@mail.ru*

Исследовали динамику содержания в плазме витамин Д связывающего белка (ВДБ) методом иммуноферментного анализа. Анализ проведен у 49 больных с деструктивными формами ( $n = 13$ ) и туберкулезом внутригрудных лимфатических узлов (ТВГЛУ)/очаговыми формами туберкулеза ( $n = 27$ ). Группу инфицированных микобактериями туберкулеза (МБТ) составили 9 пациентов, имевших контакт с больными туберкулезом и положительные кожные пробы. Проведенное исследование показало, что до начала проведения специфической противотуберкулезной химиотерапии содержание витамин Д связывающего протеина плазмы в группах больных с деструктивным туберкулезом и «малыми формами» туберкулеза органов дыхания статистически не отличалось от такового в группе инфицированных МБТ. Проводимая химиотерапия не влияла на содержание плазменного витамин Д связывающего протеина. При рассмотрении динамики изменений плазменного витамин Д связывающего протеина в подгруппах, входящих в «малые» формы, выявлены следующие динамические различия. Показано, что содержание ВДБ у больных ТВГЛУ до начала лечения было достоверно выше по сравнению с группой инфицированных МБТ ( $1,77 \pm 0,1$  мг/мл и  $1,5 \pm 0,04$  мг/мл,  $P = 0,08415$  соответственно). Показатели витамин Д связывающего протеина у больных ТВГЛУ были также достоверно выше, чем у больных очаговым туберкулезом до начала лечения и через 3 и 6 месяцев специфического лечения (0 мес. –  $1,77 \pm 0,1$  и  $1,5 \pm 0,08$ ,  $P = 0,0456$ ; 3 мес. –  $1,77 \pm 0,05$  мг/мл и  $1,4 \pm 0,08$  мг/мл,  $P = 0,04702$  и 6 мес. –  $1,9 \pm 0,09$  мг/мл и  $1,46 \pm 0,07$  мг/мл,  $P = 0,00230$ , соответственно). Следует предположить, что ВДБ связывает избыточное количество кальцитриола, который регулирует баланс TGF- $\beta 1$  у больных ТВГЛУ.

**Ключевые слова:** туберкулез, дети, подростки, витамин Д связывающий белок

## BLOOD PLASMA VITAMIN-D BINDING PROTEIN CONTENT IN CHILDREN AND ADOLESCENTS, PATIENTS WITH VARIOUS FORMS OF LUNG TUBERCULOSIS

**Averbakh M.M. (jr.), Panova L.V., Gubkina M.F., Gorelova L.A., Karpina N.L.**  
*Central Research Institute for Tuberculosis, Moscow, e-mail: amm50@mail.ru*

The dynamics plasma changes of the vitamin D binding protein (VDB) was evaluated by the enzyme immunoassay method. The analysis was carried out in 49 patients with destructive forms ( $n = 13$ ) and mediastinum lymph node tuberculosis (MTBLN) / focal forms of tuberculosis ( $n = 27$ ). The M. tuberculosis (MT) infected group was consisted of 9 patients who had contact with patients with tuberculosis and positive skin tests. The study showed that before the initiation of specific antituberculosis chemotherapy, the plasma level of vitamin D binding protein did not statistically differ between the groups of patients with destructive tuberculosis and «small forms» of respiratory tuberculosis and group of MT infected patients. The specific chemotherapy also did not affect the plasma level vitamin D binding protein during 3 and 6 months of evaluation. We found differences in the plasma vitamin D binding protein level in the subgroups included in the «small» forms of tuberculosis of the respiratory system. It was shown that the plasma VDB content in patients with MTBLN before the start of treatment was significantly higher in comparison with the group of infected MT ( $1.77 \pm 0.1$  mg / ml and  $1.5 \pm 0.04$  mg / ml,  $P = 0.08415$ , respectively). Vitamin D binding protein in MTBLN patients was also significantly higher than in patients with focal tuberculosis at 0, 3 and 6 months of specific treatment (0 mo. –  $1.77 \pm 0.1$  and  $1.5 \pm 0.08$ ,  $P = 0.0456$ ; 3 mo. –  $1.77 \pm 0.05$  mg / ml and  $1.4 \pm 0.08$  mg / ml,  $P = 0.04702$  and 6 mo. –  $1.9 \pm 0.09$  mg / ml and  $1.46 \pm 0.07$  mg / ml,  $P = 0.00230$ , respectively). It should be assumed that the VDB binds an excess amount of calcitriol, which regulates the balance of TGF- $\beta 1$  in MTBLN patients.

**Keywords:** tuberculosis, children, adolescents, vitamin D binding protein

Витамин Д связывающий белок (ВДБ), обозначаемый в литературе также как Gc-globulin, является переносчиком в плазме крови витамина Д и его метаболитов, которые в свою очередь поддерживают в организме человека уровень сывороточной концентрации кальция и гомеостаза электролитов. ВДБ является членом белкового семейства, в которое входят альбумин,  $\alpha$ -фетопротеин и  $\alpha$ -альбумин/афамин. ВДБ имеет молекулярную массу 52–59 kDa и обладает значительным полиморфизмом в виде трех основных электрофоретических

вариантов Gc1F, Gc1S и Gc2, из которых 2 первых белка обладают большей аффинностью к 25 (ОН)D. Каждый из метаболитов витамина Д имеет собственную константу аффинности к ВДБ. 25 (ОН)-витамин D3 (кальцидиол) связывается с ВДБ на 88% ( $K_a = 5 \times 10^{-8}$  M), тогда как 1,25(ОН) $_2$ -витамин D3 (кальцитриол), являющийся наиболее активным метаболитом витамина Д, связывается на 85% ( $K_a = 4 \times 10^{-7}$  M). В трех наиболее изученных вариантах ВДБ (Gc1F, Gc1S and Gc2) было выявлено около 120 редких вариантов, что говорит о зна-

чительном генетическом полиморфизме локуса ВДБ из всех на сегодня исследованных участков хромосом, кодирующих белковые структуры [1]. Основная масса ВДБ синтезируется в печени и в минорных количествах в моноцитах. Он имеет период полураспада 2,5 дня и содержится в плазме в концентрации 300–600 мкг/мл. Подобная высокая его концентрация играет важную роль в предохранении организма от интоксикации свободным витамином Д или служит своеобразным источником циркулирующего источника 25 (ОН)-vitamin D3 [2].

Метаболит витамина Д кальцитриол (1, 25(ОН)2D3) относится к иммуномодулирующим гормонам и через витамин Д-рецептор способен угнетать дифференцировку дендритных клеток, Т-хелперов, НК и цитотоксических Т-лимфоцитов. Показано, что кальцитриол снижает продукцию Тх-цитокинов и увеличивает продукцию супрессорных цитокинов TGF- $\beta$ 1 и IL-4. При туберкулезе активация микобактериальными антигенами TOLL-рецепторов приводит к повышению экспрессии витамин Д рецепторов и 1 $\alpha$ -дегидрогеназ, которые индуцируют продукцию кателицидина и киллинг *M. Tuberculosis* [3].

Помимо вышеописанной функции ВДБ способен связывать метаболиты белка цитоскелета актина, распадающегося при повреждениях тканей, и вызывающего повреждение микроциркуляторного русла с последующей функциональной недостаточностью внутренних органов. ВДБ участвует в жировом обмене, связывая мононенасыщенные и полиненасыщенные жирные кислоты, которые снижают аффинность 25(ОН)-витамина D3 и 1,25(ОН)2-витамина D3 [4].

Имеются исследования, показывающие участие ВДБ в различных компонентах воспалительных реакций. Гликозидазы Т и В клеток дегликозилируют ВДБ, превращая его в макрофаг-активирующий фактор, и инициируют проапоптотические процессы в этих клетках.

ВДБ также способен усиливать хемотаксическую активность C5a компонента комплемента посредством связывания с CD44 на мембране нейтрофилов и макрофагов, выступая в качестве кофактора C5a компонента комплемента [5].

Выявление ВДБ в сыворотке при заболеваниях легких проводилось в основном у больных неспецифическими заболеваниями легких. Повышенный уровень этого фактора был выявлен в бронхоальвеолярном лаваже у детей бронхиальной астмой, резистентной к проводимой терапии, причем была показана корреляционная зависимость

между концентрацией ВДБ и нейтрофилов и не выявлено корреляционной зависимости между этим фактором и содержанием в смыве лимфоцитов, макрофагов и эозинофилов. Не выявлено также связи с наличием у этих больных астматического статуса. Однако наиболее интересные данные по выявлению этого белка получены при изучении плазмы больных саркоидозом. Авторы изучали содержание свободного ВДБ и его содержание в комплексе с экзосомами, которые имеют размер 30–150 нм и являются производными эндосом клеток. Они выполняют роль клеточных посредников и в зависимости от клеточного микроокружения могут стимулировать или угнетать клетки иммунного ответа через индукцию ИНФ- $\gamma$ , ИЛ-8, протеинов и ферментов вовлеченных метаболизм лейкотриенов. Было показано, что уровень свободного ВДБ плазмы больных саркоидозом достаточно низкий и практически не отличается от группы здоровых добровольцев. ВДБ связанный с экзосомами определялся у больных в достоверно более высокой концентрации. Помимо этого фактора в более высоких концентрациях с экзосомами были связаны различные гликопротеины, липополисахарид-связывающий белок, кининоген-1, лактоферрин, протромбин, серотрансферрин, гаптоглобин, аполипопротеин, белки мембрано-атакующего комплекса (MAC) и ферменты метаболизма лейкотриена 4 [3].

Исследования по содержанию ВДБ в сыворотке больных туберкулезом представлены в единичных исследованиях. Так, при сравнении гематологических параметров и различных медиаторов воспаления у 45 пациентов африканского и 83 пациентов евразийского происхождения с впервые выявленным туберкулезом легких, проживающих на территории Великобритании, было показано, что больные африканского происхождения имели более низкие показатели нейтрофилов периферической крови, сывороточные концентрации хемокинов CCL2, CCL11 и ВДБ, но более высокие показатели CCL5 и антиген-стимулированной продукции ИЛ-12 и антагониста ИЛ-1  $\alpha$  рецептора. Однако различия в содержании сывороточного ВДБ были связаны с электрофоретическим генотипом. Самые низкие концентрации наблюдались у носителей генотипа Gc1F / 1F, а высокие у пациентов с генотипом Gc1S / 1S вне зависимости от этнической группы. Связи концентрации ВДБ и электрофоретического генотипа Gc2/2 и Gc2/1 не выявлено. Не показано также значимых динамических изменений этого фактора после проведенной интенсивной фазы противотуберкулезной

химиотерапии или генотипа микобактерий. Однако было отмечено, что носители генотипа Gc2/2 и Gc2/1 продуцируют ИНФ-γ в больших количествах после стимуляции антигенами ESAT-6 /CFP-10, чем носители генотипа Gc1/1 [6].

Целью настоящего исследования явилось выявление динамических изменений витамин Д связывающего белка у детей и подростков с деструктивными и «малыми» формами туберкулеза органов дыхания в процессе проведения противотуберкулезной химиотерапии.

### Материалы и методы исследования

Исследование проведено на 49 больных, разделенных на три группы. В группу больных с деструктивным туберкулезом включено 13 человек в возрасте от 14 до 17 лет. Инфильтративный туберкулез в фазе распада и обсеменения диагностирован у 6 человек, диссеминированный туберкулез в фазе распада – у 3-х человек, множественные туберкулемы в фазе распада и обсеменения – у 2-х человек, фиброзно-кавернозный туберкулез – 1 человек и казеозная пневмония – 1 человек.

В исследование включено 27 больных в возрасте от 3 до 16 лет с «малыми» формами туберкулеза органов дыхания. ТВГЛУ диагностирован у 14 человек, в том числе с очагами отсева в легочную ткань – 5 человек; очаговый туберкулез легких – 13 человек. Большинство процессов были выявлены в фазе начинающейся кальцинации – 12 чел. и реже в фазе уплотнения – 10 чел., и в фазе инфильтрации – 5 чел.

Группу инфицированных МБТ составили 9 пациентов в возрасте от 5 до 14 лет, обратившихся по поводу контакта с больными туберкулезом и имевших положительные реакции на пробу Манту с 2 ТЕ и Диаскинтест.

Витамин Д связывающий протеин определяли в К<sub>3</sub>ЭДТА плазме методом иммуноферментного анализа с помощью набора SEB810Hu (Cloud-Clone Corp.), образцы плазмы разводили согласно инструкции изготовителя. Диапазон определения тест-системы 0,156 – 10 нг/мл, минимальная определя-

мая концентрация 0,156 нг/мл. Полученные данные представлены в тексте в единицах мг/мл. Результаты обрабатывались статистически с помощью пакета Microsoft Excel.

### Результаты исследования и их обсуждение

Проведенное исследование показало, что до начала проведения специфической противотуберкулезной химиотерапии содержание витамин Д связывающего протеина плазмы в группах больных с деструктивным туберкулезом и «малыми формами» туберкулеза органов дыхания статистически не отличались от такового в группе инфицированных МБТ. Проводимая химиотерапия не влияла на содержание плазменного витамин Д связывающего протеина (таблица, рис. 1).

Поскольку в группу «малых» форм туберкулеза входят две клинико-анатомические формы – туберкулез внутригрудных лимфатических узлов (ТВГЛУ) и очаговый туберкулез легких, мы рассмотрели динамику изменений плазменного витамин Д связывающего протеина в этих подгруппах. Показано, что содержание витамин Д связывающего протеина у больных ТВГЛУ до начала лечения было достоверно выше по сравнению с группой инфицированных МБТ (1,77 ± 0,1 мг/мл и 1,5 ± 0,04 мг/мл, P = 0,08415 соответственно) (таблица, рис. 2). Показатели витамин Д связывающего протеина у больных ТВГЛУ были также достоверно выше, чем у больных очаговым туберкулезом до начала лечения и через 3 и 6 месяцев специфического лечения (0 мес. – 1,77 ± 0,1 и 1,5 ± 0,08, P = 0,0456; 3 мес. – 1,77 ± 0,05 мг/мл и 1,4 ± 0,08 мг/мл, P = 0,04702 и 6 мес. – 1,9 ± 0,09 мг/мл и 1,46 ± 0,07 мг/мл, P = 0,00230, соответственно) (таблица, рис. 2).

Концентрация витамин Д связывающего протеина (в мг/мл) плазмы крови больных исследованных групп

Срок исследования Группы наблюдения	Срок исследования		
	0 мес.	3 мес.	6 мес.
Деструктивный ТБ	1,59 ± 0,15	1,54 ± 0,03	1,65 ± 0,1
ТВГЛУ/очаговый ТБ	1,65 ± 0,07	1,57 ± 0,06	1,67 ± 0,07
Инфицированные	1,5 ± 0,04	–	–
ТВГЛУ	1,77 ± 0,1**↓	1,77 ± 0,05***	1,9 ± 0,09 *
Очаговый ТБ	1,5 ± 0,08	1,4 ± 0,08	1,46 ± 0,07

Примечания: \*P = 0,00230 по сравнению с группой очагового туберкулеза;

\*\*P = 0,0209 по сравнению с группой инфицированных;

\*\*\*P = 0,04702 по сравнению с группой очагового туберкулеза;

↓P = 0,0456 по сравнению с группой очагового туберкулеза.

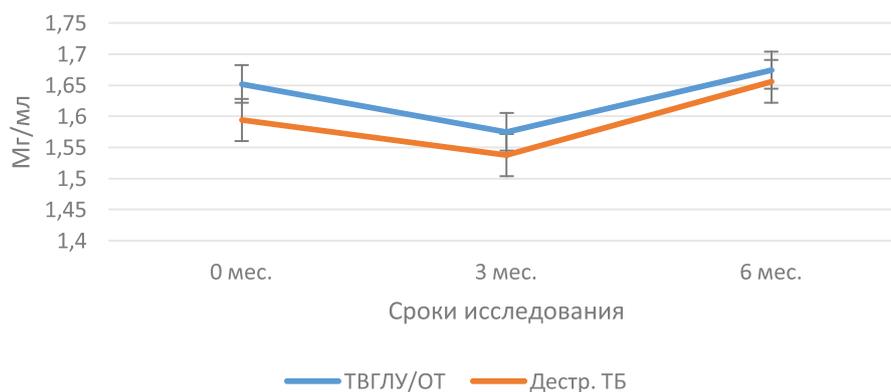


Рис. 1. Динамика витамин Д связывающего протеина плазмы крови у больных деструктивным и «малыми» формами туберкулеза органов дыхания

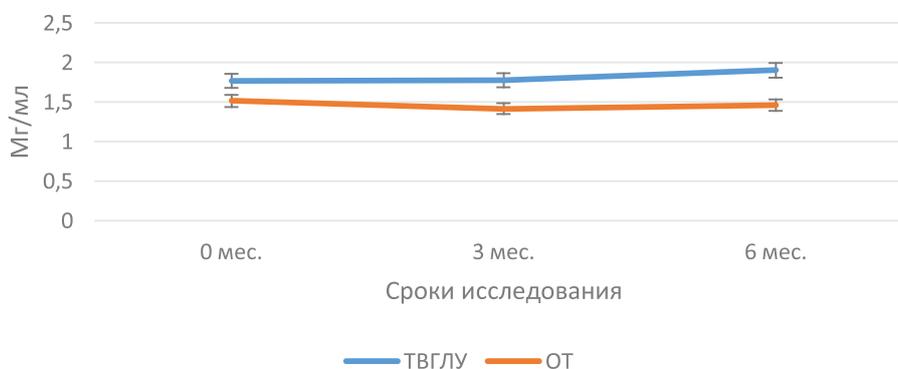


Рис. 2. Динамика витамин Д связывающего протеина плазмы крови у больных ТВГЛУ и очаговыми формами туберкулеза органов дыхания

### Заключение

Оценить значимость полученных нами данных о более высоком содержании витамин Д связывающего протеина у больных ТВГЛУ достаточно трудно, поскольку в немногочисленных исследованиях по его количественному содержанию в сыворотке в основном исследовались взрослые контингенты больных туберкулезом и вне связи с клиническими формами заболевания. Кроме того методически исследования строились на определении концентрации трех основных электрофоретических вариантов ВДБ Gc1F, Gc1S и Gc2 и для варианта Gc2 показана более высокая ассоциация с заболеваемостью туберкулезом и более высокая продукция ППД-стимулированной продукции интерферона  $\gamma$  по сравнению с носителями вариантов Gc1F и Gc1S [7]. В проведенном исследовании также показано отсутствие динамических изменений концентрации ВДБ в процессе лечения у де-

тей и подростков как с деструктивными, так и с «малыми» формами туберкулеза органов дыхания, однако выявлены достоверно более высокие показатели ВДБ у больных с ТВГЛУ по сравнению с очаговыми формами туберкулеза. Учитывая наличие различий в сывороточном содержании различных электрофоретических вариантов ВДБ [7], а также показанную на больных саркоидозом роль ВДБ, связанного с экзосомами [3], дальнейшие исследования динамики ВДБ целесообразно проводить с использованием этих более показательных методических подходов. Поскольку одной из основных функций ВДБ является инактивация метаболита кальцитриола, усиливающего избыточную продукцию супрессорных цитокинов IL-4 и TGF- $\beta$ 1, а содержание последнего фактора достаточно высоко в плазме больных ТВГЛУ [8], следует предположить регулируемую роль ВДБ в поддержании баланса продукции TGF- $\beta$ 1 у этой группы больных.

## Список литературы

1. Speeckaert M., Huang G., Delanghe J.R., Taes Y E.C. Biological and clinical aspects of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) and its polymorphism // *Clinica Chimica Acta*. – 2006. – V. 372. – P. 33–42.
2. Chishimba L., Thickett D.R., Stockley R.A., Wood A.M. The vitamin D axis in the lung: a key role for vitamin D-binding protein // *Thorax*. – 2010. – V. 65. – P. 456–462.
3. Martinez-Bravo M.-J., Wahlund C.J.E., Qazi K.R., Moulder R., Lukic A., Radmark O., Lahesmaa R., Grunewald J., Eklund A., Gabrielsson S. Pulmonary sarcoidosis is associated with exosomal vitamin D-binding protein and inflammatory molecules // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2016. DOI: 10.1016/j.jaci.2016.05.051.
4. Malik S., Fu L., Juras D.J., Karmali M., Wong B.Y.L., Gozdzik A., Cole D.E.C. Common variants of the vitamin D binding protein gene and adverse health outcomes // *Crit Rev Clin Lab Sci*. – 2013. – V. 50. – P. 1–22.
5. Bratke K., Wendt A., Garbe K., Kuepper M., Julius P., Lommatzsch M., Virchow J.C. Vitamin D binding protein and vitamin D in human allergen-induced endobronchial inflammation // *Clinical and Experimental Immunology*. – 2014. – V. 177. – P. 366–372.
6. Coussens A.K., Wilkinson R.J., Nikolayevskyy V., Elkington P.T., Hanifa Y., Islam K., Timms P.M., Bothamley G.H., Claxton A.P., Packe G.E., Darmalingam M., Davidson R.N., Milburn H.J., Baker L.V., Barker R.D., Drobniowski F.A., Mein C.A., Bhaw-Rosun L., Nuamah R.A., Griffiths C.J., Martineau A.R. Ethnic Variation in Inflammatory Profile in Tuberculosis // *PLoS Pathog*. – 2013. № 9(7): e1003468. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003468.
7. Martineau A.R., Leandro A.C.S, Anderson S.T., Newton S.M., Wilkinson K.A., Nicol M.P., Path F.C., Pienaar S.M., Skolimowska K.H., Rocha M.A., Rolla V.C., Levin M., Davidson R.N., Bremner S.A., Griffiths C.J., Eley B., Bonecini-Almeida M.G., Wilkinson R.J. Association between Gc genotype and susceptibility to TB is dependent on vitamin D status // *Eur. Respir. J.* – 2010. – V. 35. – P. 1106–1112.
8. Авербах М.М., Панова Л.В., Губкина М.Ф., Горелова Л.А. Содержание ИЛ-21 и трансформирующего фактора роста –  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) в сыворотке детей и подростков, больных различными формами легочного туберкулеза // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. – 2015. – № 5. – С. 42–45. URL: [www.rae.ru/upfs/?section=content&op=show\\_article&article\\_id=6754](http://www.rae.ru/upfs/?section=content&op=show_article&article_id=6754) (дата обращения: 17.03.2018).