

В. В. Маврутенков<sup>1</sup>, Н. В. Жукова<sup>2</sup>, Л. О. Кравчук<sup>3</sup>

ДНІПРОПЕТРОВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ<sup>1</sup>

СПЕЦІАЛІЗОВАНА ТУБЕРКУЛЬОЗНА ЛІКАРНЯ ПРИ ДНІПРОПЕТРОВСЬКІЙ ВИПРАВНІЙ

КОЛОНІЇ (№ 89)<sup>2</sup>, ДНІПРОПЕТРОВСЬК

ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО<sup>3</sup>

## РІВЕНЬ ПРОТЕЇНУ S100b У СИРОВАТЦІ КРОВІ ХВОРИХ З КО-ІНФЕКЦІЄЮ ВІЛ/ТУБЕРКУЛЬОЗ ЯК НЕЙРОСПЕЦИФІЧНИЙ БІОМАРКЕР ЯТРОГЕННОЇ НЕЙРОТОКСИЧНОСТІ

*Вивчено вплив препаратів антиретровірусної та антимикобактеріальної хіміотерапії на вивільнення з клітин нейроглії маркера ураження протеїну S100b з огляду на можливу ятрогенію. Встановлено, що незначне підвищення концентрації білка S100b у сироватці крові хворих з ко-інфекцією ВІЛ/туберкульоз після початку високоактивної антиретровірусної терапії не було пов'язане з виникненням симптомів з боку центральної нервової системи.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** ВІЛ-інфекція, туберкульоз, S100b, високоактивна антиретровірусна терапія, CD4-лімфоцити, нейротоксичність.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

**ВСТУП.** За даними офіційної статистики, кількість ВІЛ-інфікованих на кінець 2014 р. в Україні склала 263 145 осіб (кумулятивні дані), при цьому туберкульоз (ТБ) як СНІД-індикаторне захворювання реєстрували у 55 % пацієнтів [5, 6]. Як мікобактерії ТБ, так і сам збудник СНІДу здатні викликати деструктивно-запальні зміни в будь-яких структурах нервової системи, зокрема в клітинах астроглії, що утворюють гематоенцефалічний бар'єр (ГЕБ) головного мозку, зумовлюючи тим самим складний механізм розвитку енцефалопатії [1, 2]. Крім того, так звана високоактивна антиретровірусна терапія (ВААРТ), насамперед препарати класу інгібіторів зворотної транскриптази (всіх типів), має потенційну ятрогенну нейротоксичність. Так, ефавіренс® (ненуклеозидний інгібітор) – один з найбільш вживаних препаратів з арсеналу ВААРТ – володіє вираженою нейротоксичністю [3]. У зв'язку з цим, актуальним напрямком вивчення нейропатології вважають дослідження нейроспецифічних біомаркерів для розробки неінвазивних методів (кров, сеча) діагностики пошкодження нервової тканини [4]. Одним із представників групи нейроспецифічних біомаркерів є Са-зв'язувальний гліоспецифічний білок S100b [7, 9, 10, 12, 13]. Даний білок є гострофазним маркером ураження ЦНС, тобто його реєструють у максимальній концентрації в терміни від декількох годин до днів після впливу

уражаючого фактора, що зумовлює його короткий період напіввиведення (30 хв) та нирковий кліренс (близько 65 мл/хв) [15, 22]. Таким чином, вивчення вмісту протеїну S100b у сироватці крові хворих з ко-інфекцією ВІЛ/ТБ, які отримують з цього приводу ВААРТ і протитуберкульозну хіміотерапію, має, без сумніву, наукове і практичне значення.

Метою роботи було поліпшити діагностику уражень ЦНС у ВІЛ-інфікованих людей з ко-інфекцією ВІЛ/ТБ за допомогою визначення вмісту білка S100b у сироватці крові.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Групу спостереження склали 17 ВІЛ-інфікованих чоловіків віком від 27 до 46 років (середній вік – 37 років), контрольну – 5 клінічно здорових волонтерів чоловічої статі віком від 27 до 38 років. Гендерну однотипність було вибрано спеціально для виключення впливу гормональних аберацій. Дослідження проводили згідно з етичними нормами для такого типу науково-практичних робіт [14].

У пацієнтів обох груп не відзначали виснаженості, ожиріння, психічної або неврологічної патології в анамнезі. Діагноз та клінічну стадію ВІЛ-інфекції і ТБ встановлювали відповідно до національних стандартів, встановлених МОЗ України [11, 25]. Раціональну антимикобактеріальну хіміотерапію (АМБХТ) у всіх хворих обґрунтовували шляхом оцінювання меди-

© В. В. Маврутенков, Н. В. Жукова, Л. О. Кравчук, 2015.

каментозної чутливості до препаратів першого ряду методами посіву на тверді або рідкі поживні середовища за допомогою радіометричного методу швидкого визначення системою BD BACTEC™.

Вміст протеїну S100b у сироватці крові визначали методом твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA, ТІФА). Дослідження виконували на кафедрі біофізики та біохімії Дніпропетровського національного університету ім. О. Гончара за сприяння проф. Г. О. Ушакової. Тестування проводили в 96-ти лункових полістерольних планшетах (фірма "Nunc", Данія) з реактивами однієї фірми-виробника ("Sigma", США): моноспецифічними поліклональними антитілами проти протеїну S100b, очищеною субстанцією S100b як стандартом і антитілами проти Ig G кроликів, міченими пероксидазою хрому. Для оцінювання результатів вимірювали оптичну щільність на спектрометрі Anthos 2010 (Фінляндія) при довжині хвилі 492 нм. Відбирали венозну кров у дослідній групі двічі: напередодні початку ВААПТ і не раніше 3-ї та не пізніше 5-ї доби етіотропної хіміотерапії. Венозну кров після відбору негайно центрифугували, й отриману сироватку заморожували в морозильній камері при температурі -40 °С до проведення аналізу. Проби сироватки піддавали одноразовому заморожуванню безпосередньо перед дослідженням [17]. У контрольній групі клінічно здорових волонтерів рівень протеїну S100b у сироватці крові в середньому склав 1,5448 нг/мл (мінімальний – 0,865 нг/мл; максимальний – 2,613 нг/мл).

Статистичну обробку отриманих результатів дослідження проводили за допомогою програми STATISTICA 6.0. Для перевірки відповідності досліджуваної ознаки нормальному розподілу використовували критерій узгодженості Пірсона. Більшість ознак не мала нормального розподілу, тому дані наведено у вигляді Me (IQR), де Me – медіана, IQR – інтерквартильний розмах. Для порівняння застосовували непараметричні методи аналізу – W-критерій Уїлкоксона і t-критерій Стьюдента. Статистично значущими відмінностями вважали при  $p < 0,05$ .

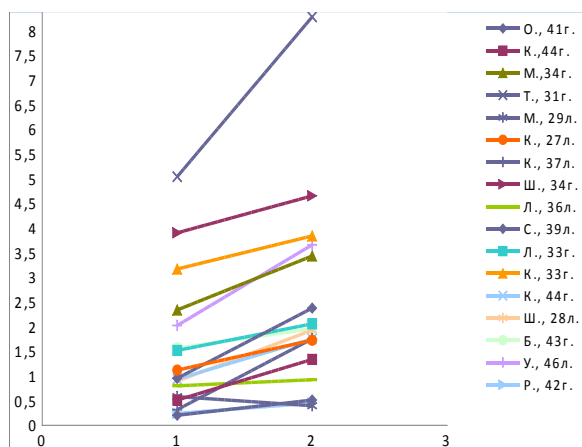
**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Абсолютно у всіх хворих після початку ВААПТ виникли неврологічні симптоми суб'єктивного характеру різної експресивності: запаморочення, цефалгія, безсоння, складність концентрації уваги, емоційна лабільність. При цьому тільки 2 (11,7 %) пацієнти припинили отримувати ВААПТ через тиждень від початку хіміотерапії через виражені побічні ефекти з боку ЦНС. Однак, як показали результати дослідження, значного підвищення

концентрації S100b у сироватці крові не спостерігали (графік 1).

У сироватці крові хворих з ко-інфекцією ВІЛ/ТБ, як до початку, так і після ВААПТ, порівняно з контрольною групою, не було виявлено значущого підвищення концентрації білка S100b для обох вибірок ( $p=0,98$  і  $p=0,31$  відповідно). Водночас відзначено статистично значуще ( $p=0,0002$ ) зростання концентрації S100b у сироватці крові на 3–5 дні від початку ВААПТ порівняно з первинним результатом, що свідчило про виникнення запалення в астроглії та збільшення проникності гематоенцефалітичного бар'єру, яке зумовлювало неврологічну симптоматику. Так, рівень протеїну S100b у спинномозковій рідині підвищився при заміні ефективної схеми ВААПТ на свідомо неефективну (монотерапію лопінавіром/ритонавіром), що свідчило про активізацію персистувального запалення в астроглії [16]. Крім того, дослідження В. J. Brew та ін. (2001) показали, що у хворих з ВІЛ-асоційованою деменцією рівень протеїну S100b у спинномозковій рідині зріс в кілька разів, особливо на більш пізніх стадіях і при швидко прогресуючій формі деменції [18].

При зіставленні рівня протеїну S100b у сироватці крові зі ступенем імуносупресії, де середній рівень CD4<sup>+</sup> в абсолютних значеннях у групі спостереження становив 213 кл/мл<sup>3</sup>, не було виявлено статистично значущої ( $p=0,62$ ) кореляції між цими двома показниками.

Відсутність значущих відмінностей у ступені підвищення рівня протеїну S100b у сироватці крові на початкових етапах ВААПТ при високому (<100 CD4<sup>+</sup> кл/мл<sup>3</sup>), або низькому ( $\geq 100$  CD4<sup>+</sup> кл/мл<sup>3</sup>) ступені імуносупресії за наявності явної нейротоксичності дозволяє припустити, що семіотика розладів ЦНС не є наслідком органічних (запальних) процесів, і в даній ситуації слід рекомендувати продовжити обрану схему ВААПТ (графік 2).



Графік 1. Індивідуальні показники динаміки концентрації S100b у сироватці крові пацієнтів з ко-інфекцією ВІЛ/ТБ, які отримували ВААПТ.

При цьому, можливо, збільшення вмісту білка S100b у сироватці крові зумовлене не ефектом ятрогенної нейротоксичності хіміопрепаратів, а ураженням ЦНС вірусом імунодефіциту, як наслідок неефективності ВААРТ [16]. Було показано, що навіть при повній вірусологічній ефективності ВААРТ завжди існує персистувальне ВІЛ-асоційоване запалення нейроглії, викликане неповним проникненням препаратів через гематоенцефалічний бар'єр і наявністю в глії деякого пулу тривало існуючих інфікованих макрофагів [8, 16, 20]. У зв'язку з цим, можливе визначення рівня протеїну S100b у крові методом ТІФА як специфічного для ЦНС біомаркера для доповнення до загальних вірусологічних та імунологічних досліджень щодо оцінки ефективності ВААРТ.

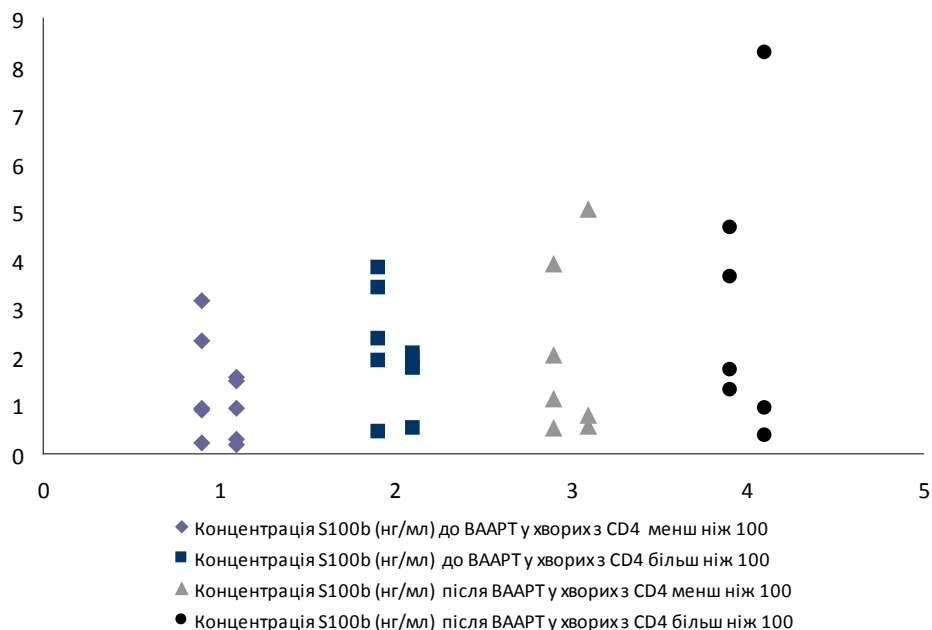
Як показав аналіз результатів дослідження, за будь-яких схем АМБХТ на початкових етапах лікування також не відзначено достовірного ( $p=0,91$ ) збільшення концентрації протеїну S100b у крові, незважаючи на наявні клінічні ознаки ятрогенної нейротоксичності (табл.).

Таким чином, фізіологічні рівні концентрації білка S100b у крові пацієнтів з ко-інфекцією ВІЛ/

ТБ, які отримували потенційно нейротоксичні, антимікобактеріальні препарати, такі, як ізоніазид, протамід, циклосерин, дозволили припустити відсутність ураження ЦНС, як ятрогенного, так і інфекційного генезу, та продовжити лікування цими препаратами.

Оскільки відомо, що рівень S100b у біологічних середовищах організму підвищується при нейроінфекціях будь-якої етіології на ранніх стадіях захворювання [19, 21], визначення рівня нейроспецифічного білка S100b у сироватці крові може бути використано для диференційної діагностики неврологічних симптомів, викликаних препаратами ВААРТ (показник не зростатиме) та синдромом відновлення імунної системи за типом нейроінфекції (буде збільшуватись концентрація білка S100b) в пацієнтів з ко-інфекцією ВІЛ/ТБ, які отримують одночасно ВААРТ і АМБХТ.

Однією з можливих причин відсутності підвищення концентрації білка S100b у сироватці крові пацієнтів з ко-інфекцією ВІЛ/ТБ, які отримують одночасно ВААРТ і АМБХТ, є дизайн дослідження – визначення вмісту цього білка на ранніх (<7 днів) етапах комбінованої хіміотерапії.



Графік 2. Індивідуальні значення концентрацій S100b у сироватці крові залежно від глибини імуносупресії.

Таблиця – Індивідуальні показники динаміки сироваткової концентрації протеїну S100b у крові пацієнтів з ко-інфекцією ВІЛ/ТБ залежно від ступеня імуносупресії та схеми АМБХТ на тлі проведеної ВААРТ

Діапазон CD4 <sup>+</sup> /тип туберкульозного процесу	Менш ніж 100 кл/мл (n=9), нг/мл	Більш ніж 100 кл/мл (n=8), нг/мл	ВІЛ 1 кл.ст. (n=1), нг/мл	ВДТБ РТБ ІТБ (n=12), нг/мл	МРТБ (n=4), нг/мл
Медіана зміни S100b	0,8135 (+/-0,3)	0,6781 (+/-0,18)	0,124	0,7422 (+/-0,18)	1,0984 (+/-0,64)

Примітка. ВДТБ – вперше діагностований туберкульоз; РТБ – рецидив туберкульозу; ІТБ – інший туберкульоз; МРТБ – мультирезистентний туберкульоз.

Даний методичний підхід був оснований на тому факті, що це один із перших біомаркерів, які секретуються пошкодженими клітинами нейроглії [23, 24]. Тому підвищення білка S100b у сироватці крові можна очікувати в більш пізні терміни за умови ятрогенного або інфекційного ураження ЦНС.

**ВИСНОВКИ.** 1. Білок S100b можна визначати в сироватці крові хворих з ко-інфекцією ВІЛ/ТБ, які отримують одночасно ВААРТ та АМХТБ, у комплексі з іншими лабораторними й інструментальними дослідженнями для діагностики ураження нервової системи.

2. Даний показник є маркером безпечності використання наявної схеми ВААРТ, тобто фізіологічний рівень білка S100b у крові пацієнтів з ко-інфекцією ВІЛ/ТБ дозволяє продовжити ВААРТ і АМБХТ, незважаючи на наявні суб'єктивні симптоми ятрогенної нейротоксичності.

3. Визначення рівня нейроспецифічного білка S100b у сироватці крові можна використовувати як неінвазивну методику диференційної діагностики ятрогенної енцефалопатії та синдрому відновлення імунної системи за типом нейроінфекції в пацієнтів з ко-інфекцією ВІЛ/ТБ, які отримують одночасно ВААРТ і АМБХТ.

4. При аналізі результатів відзначено тенденцію до підвищення рівня білка S100b у сироватці крові після початку ВААРТ, але суворості закономірності встановлено не було, тобто перспективним на даний час залишається дослідження білка S100b у сироватці крові хворих через 1–3 місяці після початку ВААРТ для визначення динаміки вивільнення його астроцитами й іншими клітинами глії та оцінки можливості виникнення віддаленої ятрогенії при тривалому застосуванні препаратів АМХТБ і ВААРТ.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Антиретровірусная терапия ВИЧ-инфекции: что, когда и почему? / А. Г. Дьяченко, С. Л. Грабовый, П. А. Дьяченко, Е. Н. Горобченко // Туберкулез, легеневі хвороби, ВІЛ-інфекція. – 2014. – 1 (16). – С 68–76.
2. Данные Украинского центра по контролю за социально опасными болезнями МЗ Украины. – 2014.
3. Нго Т. Т. Иммуноферментный анализ / Т. Т. Нго, Г. Ленхофф. – М. : Мир, 1988. – 444 с.
4. Обследование и антиретровірусная терапия у взрослых и подростков : клинический протокол для Европейского региона ВОЗ (обновленная версия 2012).
5. Про затвердження Інструкції про проведення клінічних випробувань лікарських засобів та експертизи матеріалів клінічних випробувань та Типового положення про комісію з питань етики : наказ МОЗ України від 13.02.06 № 66.
6. Про затвердження та впровадження медико-технологічних документів зі стандартизації медичної допомоги при туберкульозі : наказ МОЗ України від 04.09.14 № 620.
7. Хоффман К. Лечение ВИЧ-инфекции / К. Хоффман. – М. : Р. Валент, 2012. – 736 с.
8. Antenatal glucocorticoid treatment affects preterm infants S100B urine concentration in a dose-dependent manner / A. Sannia, F. M. Risso, L. D. Serpero [et al.] // Clin. Chim. Acta. – 2010. – 411. – P. 1539–1541.
9. ECDC/WHO European Office HIV Report 2011.
10. Elimination of S100b and renal function after cardiac surgery / H. Jonsson, P. Johnsson, P. Hoglund [et al.] // Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia. – 2000. – 14 (6). – P. 698–701.
11. Functions of S100b protein / R. Donato, B. R. Cannon, G. Sorci [et al.] // Current Molecular Medicine. – 2013. – 13, № 1. – P. 24–57.
12. Heizmann C.W. S100 proteins: structure, functions and pathology / C. W. Heizmann, G. Fritz, B. W. Schaefer // Frontiers in Bioscience. – 2002. – 7. – P. 1356–1368.
13. Increased S100b in Cerebrospinal Fluid of Infants with Bacterial Meningitis: Relationship to Brain Damage and Routine Cerebrospinal Fluid Findings / D. Gazzolo, D. Grutzfeld, F. Michetti [et al.] // Clinical Chemistry. – 2004. – 50, № 5. – P. 941–944.
14. Lennart M. Astrocytes in infectious and immunemediated diseases of the central nervous system / M. Lennart, M. Eddelston // The FASEB Journal. – 1228 (7). – P. 1226–1232.
15. Marked Increase of the Astrocytic Marker S100b in the Cerebrospinal Fluid of HIV-infected Patients on LPV/r-Monotherapy / R. A. Du Pasquier, S. Jilek, M. Kalubi [et al.] // AIDS. – 2013. – 27, № 2. – P. 203–210.
16. Neonatal S100b protein levels after prenatal exposure to selective serotonin reuptake inhibitors / J. L. Pawluski, L. A. Galea, U. Brain [et al.] // Pediatrics. – 2009. – 124. – P. 662–670.
17. Pathogenesis of Central Nervous System Tuberculosis / A. Be. Nicholas, S. K. Kwang, W. R. Bishai, S. K. Jain // Current Molecular Medicine. – 2009. – 9. – P. 94–99.
18. Pemberton L.A. Cerebrospinal fluid S-100-beta and its relationship with AIDS dementia complex / L. A. Pemberton, B. J. Brew // Journal of Clinical Virology. – 2001. – 22, № 3. – P. 249–253.

19. Rapid elimination of protein S-100B from serum after minor head trauma / W. Townend, C. Dibble, K. Abid [et al.] // Journal of Neurotrauma. – 2006. – **23** (2). – P. 149–155.

20. S100beta as a novel and accessible indicator for the presence of monocyte-driven encephalitis in AIDS / N. A. Renner, R. K. Redmann, T. Moroney-Rasmussen [et al.] // Neuropathology and Applied Neurobiology. – 2012. – **38**, № 2. – P. 162–174, doi: 10.1111/j.1365-2990.2011.01200.x.

21. Sen J. Extracellular fluid S100B in the injured brain: a future surrogate marker of acute brain injury? / J. Sen // Acta Neurochir. – 2005. – **147**. – P. 897–900.

22. Serum S100b. A noninvasive marker of blood-brain barrier function and brain lesions / A. A. Kanner,

N. Marchi, V. Fazio [et al.] // Cancer. – 2003. – **97**. – P. 2806–2813.

23. Serum S100B levels in patients with cerebral and extracerebral infectious disease / J. Undén, B. Christensson, J. Bellner [et al.] // Infect Dis. – 2004. – **36** (1). – P. 10–13.

24. Studahl M. Serum S-100b protein levels in patients with herpes simplex encephalitis and tick-borne encephalitis A marker of CNS damage during the initial stage of disease / M. Studahl, G. Günther, L. Rosengren // Journal of Neurology. – 2009. – **256**, Issue 4. – P. 586.

25. The S100b protein in biological fluids: more than a lifelong biomarker of brain distress / F. Michetti, V. Corvino, G. M. Concetta, W. Lattanzi // Journal of Neurochemistry. – 2012. – **120**. – P. 644–659.

**В. В. Маврутенков<sup>1</sup>, Н. В. Жукова<sup>2</sup>, Л. А. Кравчук<sup>3</sup>**  
**ДНЕПРОПЕТРОВСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ<sup>1</sup>**

**СПЕЦИАЛИЗИРОВАННАЯ ТУБЕРКУЛЕЗНАЯ БОЛЬНИЦА ПРИ ДНЕПРОПЕТРОВСКОЙ  
ИСПРАВИТЕЛЬНОЙ КОЛОНИИ (№ 89)<sup>2</sup>, ДНЕПРОПЕТРОВСК**

**ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО<sup>3</sup>**

## **УРОВЕНЬ ПРОТЕИНА S100b В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ С КО-ИНФЕКЦИЕЙ ВИЧ/ТУБЕРКУЛЕЗ КАК НЕЙРОСПЕЦИФИЧЕСКИЙ БИОМАРКЕР ЯТРОГЕННОЙ НЕЙРОТОКСИЧНОСТИ**

### **Резюме**

*Было изучено влияние препаратов антиретровирусной и антимикобактериальной химиотерапии на высвобождение из клеток нейроглии маркера поражения протеина S100b, в разрезе возможной ятрогении. Установлено, что незначительное повышение концентрации белка S100b в сыворотке крови больных с ко-инфекцией ВИЧ/туберкулез после начала высокоактивной антиретровирусной терапии не было связано с возникновением симптомов со стороны центральной нервной системы.*

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** ВИЧ-инфекция, туберкулез, S100b, высокоактивная антиретровирусная терапия, CD4-лимфоциты, нейротоксичность.

**V. V. Mavrutenkov<sup>1</sup>, N. V. Zhukova<sup>2</sup>, L. O. Kravchuk<sup>3</sup>**

**DNIPROPETROVSK MEDICAL ACADEMY<sup>1</sup>**

**SPECIALIZED TB HOSPITAL ATTACHED TO DNIPROPETROVSK PENAL COLONY (№ 89)<sup>2</sup>,**

**DNIPROPETROVSK**

**I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPII STATE MEDICAL UNIVERSITY<sup>3</sup>**

## **THE LEVEL OF S100b PROTEIN IN BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH HIV/TB CO-INFECTIOIN AS A NEUROSPECIFIC BIOMARKER OF NEUROTOXICITY**

### **Summary**

*There was studied the influence of antiretroviral and antimycobacterial chemotherapy on releasing from the glia cell marker lesions – S100b protein in the context of possible iatrogenic. It was established that a slight increase in the concentration of S100b protein in blood serum of patients with co-infection of HIV/TB after starting HAART was not associated with the occurrence of symptoms of the central nervous system.*

**KEY WORDS:** HIV, tuberculosis, S100b, highly active antiretroviral therapy, CD4-lymphocytes, neurotoxicity.

*Отримано 19.03.15*

**Адреса для листування:** Н. В. Жукова, ДЗ "Міська клінічна лікарня № 21 ім. Є. Г. Попкової" ДОР, вул. Канатна, 17, Дніпропетровськ, Україна, e-mail: loryuch23@mail.ru.