

## ИННОВАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ДИАГНОСТИКЕ И ЛЕЧЕНИИ ТУБЕРКУЛЕЗНОГО ПОРАЖЕНИЯ

ЖУРАВЛЕВ В. Ю., БЕЛЯКОВ М. В., АРЧАКОВА Л. И., ГУСЕВА В. Н.,  
ВИНОГРАДОВА Т. И., МУШКИН А. Ю., ВАСИЛЬЕВА И. Н., ВИШНЕВСКИЙ Б. И.,  
член-корреспондент РАМН ЛЕВАШЕВ Ю. Н., ГОРДЕЕВ С. К. \*

ФГУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт  
фтизиопульмонологии Росмедтехнологий»,  
\*ФГУП «Центральный научно-исследовательский институт материалов»,  
Санкт-Петербург

**Журавлев В. Ю., Беляков М. В., Арчакова Л. И., Гусева В. Н., Виноградова Т. И., Мушкин А. Ю., Васильева И. Н., Вишневский Б. И., Левашев Ю. Н., Гордеев С. К.** Инновационные технологии в диагностике и лечении туберкулезного поражения // Мед. акад. журн. 2009. Т. 9. № 4. С. 68–74. ФГУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии Росмедтехнологий», 191036, Санкт-Петербург, Лиговский пр., 2/4; ФГУП «Центральный научно-исследовательский институт материалов», Санкт-Петербург, 191014, Парадная, д.8.

Изучена возможность использования трехмерных наночипов для экспресс-диагностики лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* к изониазиду (в генах *katG*, *inhA*, межрегуляторной области генов *ahpC-oxuR*), рифампицину (ген *rpoB*). Исследована наследственная предрасположенность к туберкулезу органов дыхания на основе молекулярного генотипирования генов II класса главного комплекса гистосовместимости локусов HLA-DQB1\* и HLA-DRB1\*. Экспериментально и клинически доказана эффективность применения в хирургии спондилитов имплантатов из углерод-углерода, изготовленных с применением наномолекулярного синтеза. Имплантаты обладают высокой прочностью, обеспечивают сохранение операционной коррекции кифоза и предотвращают его нарастание в отдаленные сроки, улучшают условия для сращения свободных костных трансплантатов.

**Ключевые слова:** туберкулез, диагностика, наночипы, резистентность, HLA-типирование, наследственная предрасположенность, углеродные наноматериалы, передний спондилит, имплантат, туберкулезный спондилит, остеомиелит позвоночника.

**Zuravlev V. Y., Belyakov M. V., Archakova L. I., Guseva V. N., Vinogradova T. I., Mushkin A. Y., Vasilieva I. N., Vishnevskiy B. I., Levashov Y. N., Gordeev S. K.** Innovation technology in diagnostics and therapy of tuberculosis // Med. Acad. Journ. 2009. Vol. 9. № 4. P. 68–74. Scientific research institute of ftisiopulmonology, St. Petersburg, 191036; Central scientific research institute of materials, St. Petersburg, 191014.

The opportunity of use microchip for fast and specific diagnostics of multidrug resistant of *M. tuberculosis* to isoniazid (in genes *katG*, *inhA*, *ahpC*), to rifampicin (a gene *rpoB*) is studied. It is carried out research of hereditary predisposition to a tuberculosis of lungs on the basis of molecular HLA typing genes of II class of the main complex histocompatibility loci HLA-DQB1\* and HLA-DRB1\*. The possibilities to use in the surgery of TB and non-specific spondylitis the new carbon-carbon implants which prepared with nano-technologies, were examined in experimental and clinical studies. The new implants has a high stiffness, they can protect the spine from deterioration of kyphosis after surgery, they stimulate the bio-implants' adaptation in combine anterior fusion and they can used as a container for antibiotics with their long-time therapeutic concentration in plastic zone without complications and side effects. The combination of the given innovative approaches allows to identify simultaneously the mutations responsible for sensitivity of the activator of a tuberculosis to the basic antitubercular preparations, to generate at an early stage of group with the raised risk of a failure of tubercular defeat and purposefully to spend the strengthened, individualized therapy.

**Key words:** tuberculosis, diagnostics, microchip, resistency, HLA-typing, hereditary predisposition, carbon nano-material, tuberculosis spondylitis, spinal osteomyelitis, anterior fusion, implants.

Напряженная эпидемическая ситуация по туберкулезу в Российской Федерации обусловлена его поздней диагностикой, циркулирующей в популяции штаммов возбудителя с множественной резистентностью к противотуберкулезным препаратам, высокой заболеваемостью лекарственно-резистентными формами, недооценкой наследственной предрасположенности к туберкулезу и низкой эффективностью терапии.

Во фтизиатрии в настоящее время сложилась патологическая ситуация, когда для выявления патологического процесса у пациента все чаще используются современные лучевые методы, которые подкрепляются активным внедрением высокотехнологичных, мал инвазивных технологий получения диагностического материала и при этом верификация диагноза туберкулеза директивно основывается на применении мет



дов этиологической диагностики конца XIX – начала XX в. При этом практически не учитываются индивидуальные «генетические» характеристики макроорганизма больного, что в итоге вносит негативный вклад в эффективность химиотерапии туберкулеза и нивелирует возможность раннего прогнозирования исхода заболевания.

Активное использование хирургических методов лечения туберкулезного поражения требует внедрения современных подходов, основанных на применении высокотехнологичных материалов. Полноценное замещение образующихся в ходе хирургического вмешательства обширных межтеловых диастозов остается одной из наиболее актуальных проблем современной хирургии воспалительных заболеваний позвоночника. Использование традиционных биологических трансплантатов и ряда небиологических имплантатов для переднего спондилодеза в 5,9–40% случаев сопровождается неудовлетворительными результатами, обусловленными их резорбцией, псевдоартрозами, несрастанием с донорским ложем и т. д. [2, 8, 19, 15], что требует поиска новых материалов для стабилизации позвоночника. Результатом одного из таких исследований стало создание в лаборатории углеродных и карбидных материалов ФГУП «Центральный НИИ материалов» углеродного композиционного материала, полученного с использованием технологии наномолекулярного синтеза.

Цель исследования:

- оценить вклад молекулярно-генетических методов в этиологической диагностике, оптимизации химиотерапии туберкулезного процесса и определении наследственной предрасположенности к туберкулезу органов дыхания;
- изучить возможность использования новых имплантатов из углерод-углерода, изготовленных с применением наномолекулярного синтеза, в хирургии воспалительных заболеваний позвоночника.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исучены возможности использования трехмерных наночипов для экспресс-диагностики генетической характеристики лекарственной устойчивости у 483 больных туберкулезом. ДНК из клинического материала (мокрота, промывные воды бронхов) выделяли с использованием коммерческого набора проба-НК фирмы «ДНК-технология» (Москва, Россия) согласно рекомендациям производителя. Биологический микрочип (рис. 1) «ТБ-Биочип», разработанный в Институте молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН (ИМБ РАН), позволяет одновременно определять дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) МБТ и идентифицировать мутации, ответственные за чувствительность возбудителя ту-

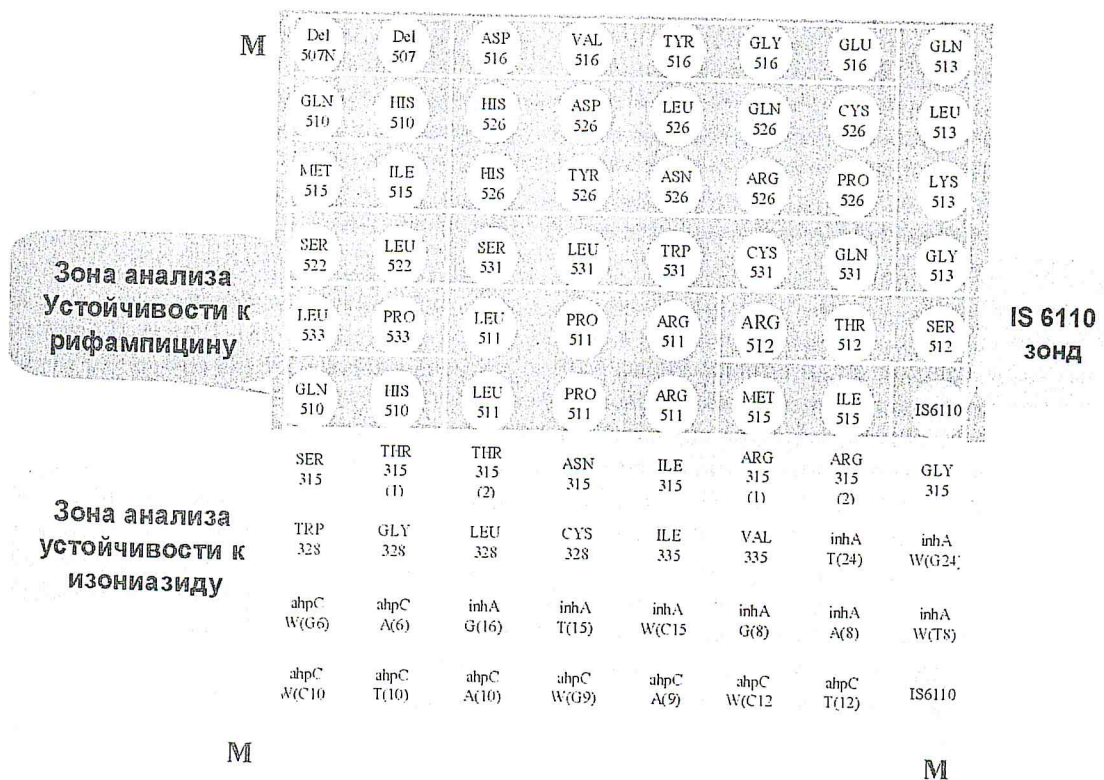


Рис. 1. Схема размещения дискриминирующих олигонуклеотидов на ТБ-Биочипе для одновременного обнаружения возбудителя туберкулеза и выявления мутаций, приводящих к устойчивости к рифампицину и изониазиду







4 (1,6%). Однако потеря активности katG не проходит для бактерии бесследно; штаммы, не обладающие активностью каталазы/пероксидазы, менее вирулентны [14], и для бактерии выгодно вносить небольшие изменения, «точечные» мутации, которые бы приводили к возникновению устойчивости к изониазиду, но при этом не сопровождались бы потерей активности фермента. Именно это и наблюдается при мутации Ser315-Thr. Замена katG315AGC-ACC (Ser-Thr) была отмечена у 92 (36,8%) больных.

Преобладание штаммов с сочетанием мутаций groB531 и katG315 еще раз подтверждает поддержание резервуара резистентных и мультирезистентных штаммов генотипа Beijing на территории северо-запада России в условиях широкого применения R и H [7].

Изониазид ингибирует синтез миколовых кислот. Белок inhA участвует в синтезе миколовых кислот и придает устойчивость к H при мутациях или повышенной экспрессии. В гене inhA были обнаружены замены нуклеотидов у 84 (17,4%) больных. Мутации в inhA также придают устойчивость к этионамиду [10]. Ген inhA является мишенью препарата триклозана, часто используемого местного противомикробного средства. Возможно, в быстроте развития лекарственной устойчивости к H играет роль широкое использование данного вещества в быту и формирование ассоциированных мутаций.

В гене ahpC выявлено наименьшее количество мутаций – 26 (5,4%), идентифицированы в положении -6 и -10 относительно сайта инициации транскрипции. Ген ahpC кодирует алкилгидропероксидазу и отвечает за дополнительную защиту микробной клетки от пероксидов.

Следует отметить, что среди исследуемых штаммов МБТ выявлено только 9 (1,8%), имеющих мутации во всех изучаемых генах. В 3 генах мутации имели 77 (15,9%) штаммов, в 2 генах – 203 (42%), в 1 гене – 91 (18,8%). Штаммов без выявленных мутаций только 103 (21,3%).

Технологический подход на основе определения мутаций, ответственных за множественную лекарственную устойчивость, с помощью наночипов оказался более чувствительным методом при сравнении результатов, полученных в традиционном микробиологическом исследовании на плотных питательных средах. У 75 (15,5%) пациентов выявлены мутации, не получившие фенотипического отображения при посеве на плотные или жидкие питательные среды. Параллельно выполненные исследования на 127 штаммах МБТ подтвердили ранее полученные результаты при работе с клиническим материалом.

Развитие туберкулеза не только связано с биологическими свойствами микроорганизма, но и во многом определяется генетическими факторами [1,

4, 6]. К настоящему времени известно более 4000 моногенных болезней, являющихся следствием мутаций единичного гена, и более 600 хромосомных болезней, обусловленных изменением числа или структуры хромосом, однако доля их неизмеримо мала среди всей патологии у человека в сравнении с мультифакториальными заболеваниями, при которых пожизненный риск (lifetime risk) достаточно высок. Туберкулезную инфекцию можно отнести к этой группе заболеваний. Система HLA генов II класса является наиболее значимым звеном генетического контроля восприимчивости к инфекционным заболеваниям вообще и к туберкулезу в частности, так как в ней расположены гены иммунного ответа, ответственные за распознавание инфекта, кооперацию клеток и дальнейшее развитие иммунного ответа [5, 11].

Определение групп риска по параметрам возникновения и неблагоприятного течения туберкулеза органов дыхания очень важно и связано с идентификацией генов, от которых зависит восприимчивость или резистентность организма человека к туберкулезной инфекции, в частности генов II класса главного комплекса гистосовместимости локусов HLA-DQB1\* и HLA-DRB1\*.

Для локуса HLA-DRB1\* известно 13 типов аллелей. Анализируя результаты, полученные при проведении исследования, можно констатировать, что 16-й аллель достоверно более часто фиксировался у больных туберкулезом органов дыхания (17,5% против 6,9% у здоровых,  $p < 0,05$ ). Относительный риск (RR) заболеть туберкулезом у здоровых лиц – носителей 16-го аллеля равен 2,9.

Для локуса HLA-DQB1\* известно 5 типов аллелей. Данные генетического типирования частот встречаемости аллелей локуса HLA-DQB1\* изучены у 114 больных туберкулезом легких и 88 здоровых доноров. Сопоставление результатов показало, что у больных туберкулезом легких значительно чаще встречается 05-й аллель (42,0%,  $p < 0,05$ ) по сравнению со здоровыми лицами (29,5%), относительный риск (RR) заболеть туберкулезом у здоровых лиц – носителей 05-го аллеля равен 3,3. Реже фиксировали 03-й аллель (44,7% против 62,5%,  $p < 0,05$ ,  $RR = 0,3$ ).

Таким образом, с наличием в генотипе 16-го аллеля HLA DRB1\* и 05-го HLA-DQB1\* связан риск развития туберкулеза легких ( $RR = 2,9$  и  $RR = 3,3$ ). Определена отрицательная ассоциация туберкулезной инфекции с 03-м аллелем локуса HLA-DQB1\* ( $RR = 0,3$ ).

Изучение межлокусных взаимосвязей выявило, что для больных, имеющих в генотипе сочетание 05-го аллеля HLA-DQB1\* и 16-го HLA-DRB1\*, отмечены достоверные различия частот встречаемости сочетания данных маркеров – 36,7% против 11,5%











6. Маянский Н.А., Маянский А.Н. Номенклатура и функции главного комплекса гистосовместимости человека // Иммунология. 2006. № 1. С. 43–46.
7. Нарвская О.В., Мокроусов И.В., Лимещенко Е.В. и др. Характеристика циркулирующих на северо-западе России штаммов *Mycobacterium tuberculosis* с использованием сполитотипирования // Пробл. туб. и болезней легких. 2002. № 4. С. 44–47.
8. Никитин Г.Д., Салдун Г.П., Корнилов Н.В. и др. Костная и металлическая фиксация позвоночника при заболеваниях, травмах и их последствиях. СПб., 1998. 447 с.
9. Шаламов А.М., Лавруков А.М., Журавлев А.А. О новом подходе к лечению туберкулезного спондилита // Высокие технологии в травматологии и ортопедии: Организация, диагностика, лечение, реабилитация, образование: Материалы I съезда травматологов-ортопедов Уральского федерального округа. Екатеринбург, 2005. С. 178–179.
10. Banerjee A., Dubnau E., Quemard A. et al. inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis* // Science. 1994. Vol. 263. P. 8235–8241.
11. Dubaniewicz A., Lewko B., Moszkowska G. et al. Molecular subtypes of the HLA-DR antigens in pulmonary tuberculosis // Int. J. Infect. Dis. 2000. Vol. 4. № 3. P. 129–133.
12. Jin D.J., Gross C.A. Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli* rpoB gene that lead to rifampicin resistance // J. Mol. Biol. 1988. Vol. 202. P. 45–58.
13. Telenti A., Imboden P., Marchesi F. et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* // Lancet. 1993. Vol. 341. P. 647–650.
14. van Soolingen D., de Haas P.E.W., van Doorn H. et al. Mutation at aminic acid position 315 at the katG gene are associated with high-level resistance to isoniazid, other drug resistance and successful transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in the Netherlands // J. Infect. Dis. 2000. Vol. 182. P. 1788–1790.
15. Hodgson A.R., Stock F.E. The Classic: Anterior spinal fusion: a preliminary communication on the radical treatment of Pott's disease and Pott's paraplegia. 1956 // Clin. Orthop. Relat. Res. 2006. Vol. 444. P. 10–15.