

C.Z.U.: 616.155.32:616-002.5-036.65

DOI: <https://doi.org/10.52692/1857-0011.2025.3-83.07>

CARACTERISTICI ALE PROLIFERĂRII LIMFOCITELOR T ÎN FUNCȚIE DE STRESUL OXIDATIV ȘI ACTIVITATEA ANTIOXIDANTĂ LA PACIENȚII CU RECIDIVĂ A TUBERCULOZEI PULMONARE

Elena TUDOR¹, dr. în șt. med., conf. cercet., membru-coresp. AȘMM,

Serghei GHINDA¹, dr. hab. în șt. med., prof. cercet.,

Valentin GUDUMAC², dr. hab. în șt. med., prof. univer.

Elena PRIVALOV¹, dr. în șt. biol., conf. cercet.

Natalia ZINCENCO¹, cercet. șt. stagiar

¹IMSP Institutul de Pneumologie „Chiril Draganuic”, Chișinău, Republica Moldova

²IP Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova

e-mail: elenatudor.ifp@gmail.com

Rezumat.

Studiul a inclus 130 de pacienți, care au cuprins: a) grupul de bază – 65 de pacienți cu recidivă a tuberculozei pulmonare și b) un grup de control - 65 de pacienți cu tuberculoză pulmonară. Au fost determinate formula leucocitară a pacienților, proliferarea limfocitelor în reacția de transformare a blastelor limfocitare cu fitohemaglutinină, starea reacțiilor de stres oxidativ și activitatea antioxidantă. Studiul a arătat că la pacienții cu recidivă a tuberculozei pulmonare: proliferarea limfocitelor în ambele grupuri de pacienți a fost semnificativ mai mică decât la grupul de control sănătos, iar la pacienții cu recidivă a tuberculozei pulmonare, conținutul de limfocite transformate a fost chiar mai mic decât la pacienții fără recidivă; La pacienții cu recidivă a tuberculozei pulmonare, gradul de deteriorare oxidativă a proteinelor și predispoziția lipoproteinelor la oxidare cresc semnificativ conform markerului AOPP și indicatorului de stres oxidativ malondialdehidă (MDA), ceea ce indică severitatea reacțiilor de stres oxidativ la acești pacienți comparativ cu pacienții cu tuberculoză pulmonară; Pacienții cu recidivă a tuberculozei pulmonare au avut o activitate antioxidantă totală semnificativ mai mică, determinată prin metoda ABTS și metoda CUPRAC, ceea ce reflectă suprimarea activității antioxidante totale; pacienții cu recidivă a tuberculozei pulmonare au avut o activitate semnificativ mai mică a enzimei superoxid dismutază, ceea ce reflectă suprimarea activității legăturii enzimatic de protecție antioxidantă; la pacienții cu recidivă a tuberculozei pulmonare, s-a observat o creștere mai pronunțată și mai sigură a activității proteinelor haptoglobinei și ceruloplasminei în comparație cu pacienții cu tuberculoză pulmonară; La pacienții cu recidivă a tuberculozei pulmonare, malondialdehida (MDA) și activitatea enzimei superoxid dismutază și catalază pot fi potențiali biomarkeri ai indicilor de proliferare limfocitară suprimați datorită unei corelații puternice.

Cuvinte cheie: recidivă a tuberculozei pulmonare, recidivă, imunologie, biochimie, stres oxidativ, activitate antioxidantă.

Summary. Characteristics of T lymphocyte proliferation depending on oxidative stress and antioxidant activity in patients with relapsed pulmonary tuberculosis.

The study included 130 patients, which comprised: a) an main group - 65 patients with relapsed pulmonary tuberculosis and b) a control group - 65 patients with pulmonary tuberculosis. The patients' leukocyte formula, lymphocyte proliferation in the lymphocyte blast transformation reaction with phytohemagglutinin, the state of oxidative stress reactions and antioxidant activity were determined. The study showed that in patients with relapsed pulmonary tuberculosis: lymphocyte proliferation in both groups of patients was significantly lower than in healthy controls, and in patients with relapsed pulmonary tuberculosis, the content of transformed lymphocytes was even lower than in patients without relapse; In patients with relapse of pulmonary tuberculosis, the degree of oxidative damage to proteins and the predisposition of lipoproteins to oxidation significantly increase according to the AOPP marker and the oxidative stress indicator malondialdehyde (MDA), which indicates the severity of oxidative stress reactions in these patients compared to patients with pulmonary tuberculosis; patients with relapse of pulmonary tuberculosis had significantly lower total antioxidant activity, determined by the ABTS method and the CUPRAC method, which reflects the suppression of total antioxidant activity; patients with relapse of pulmonary tuberculosis had significantly lower activity of the superoxide dismutase enzyme, which reflects the suppression of the activity of the enzymatic link of antioxidant protection; in patients with relapse of pulmonary tuberculosis, a more pronounced and reliable increase in the activity of haptoglobin and ceruloplasmin proteins was noted compared to patients with pulmonary tuberculosis; In patients with relapsed tuberculosis, malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase and catalase enzyme activity may be potential biomarkers of suppressed lymphocyte proliferation indices due to a strong correlation.

Keywords: pulmonary tuberculosis, relapse, immunology, biochemistry, oxidative stress, antioxidant activity.

Резюме. Особенности пролиферации лимфоцитов Т в зависимости от показателей оксидативного стресса и антиоксидативной активности у больных с рецидивом туберкулеза легких.

В исследование включены 130 больных, которые составили: а) основную группу – 65 пациентов с рецидивом туберкулеза легких и б) контрольную группу - 65 пациентов с туберкулезом легких. У больных определяли лейкоформулу, пролиферацию лимфоцитов в реакции бласттрансформации лимфоцитов с фитогемагглютинином, состояние реакций оксидативного стресса и антиоксидативной активности. Проведенное исследование показало, что у больных с рецидивом туберкулеза легких: пролиферация лимфоцитов в обеих группах больных было достоверно меньше, чем у здоровых, причем у больных с рецидивом туберкулеза легких содержание трансформированных лимфоцитов было еще меньше, чем у больных без рецидива; у больных с рецидивом туберкулеза легких достоверно увеличивается степень окислительного повреждения белков и предрасположенность липопротеинов к окислению по данным маркера АОРР и показателем оксидативного стресса малонового диальдегида (МДА), что свидетельствует о выраженности у этих больных реакций оксидативного стресса по сравнению с больными туберкулезом легких; у больных с рецидивом туберкулеза легких была достоверно более низкая общая антиоксидантная активность, определяемая методом ABTS и методом CUPRAC, что отражает подавление общей антиоксидантной активности; у больных с рецидивом туберкулеза легких была достоверно более низкая активность фермента супероксиддисмутазы, что отражает подавление активности ферментного звена антиоксидантной защиты; у больных с рецидивом туберкулеза легких отмечено более выраженное и достоверное повышение активности белков гаптоглобина и церулоплазмينا в сравнении с больными туберкулезом легких; у больных с рецидивом туберкулеза малоновый диальдегид (МДА) и активность фермента супероксиддисмутазы и каталазы могут быть потенциальными биомаркерами подавленных показателей пролиферации лимфоцитов из-за сильной корреляционной связи.

Ключевые слова: туберкулез легких, рецидив, иммунология, биохимия, оксидативный стресс, антиоксидативная активность.

Introducere.

Două variabile sunt considerate corelate dacă o modificare a uneia provoacă modificare corespunzătoare celeilalte. Corelația, ca metodă de determinare a relației dintre două variabile, este valoroasă pentru precizarea modului în care o variabilă se va modifica sub influența alteia, pentru a identifica potențiali biomarkeri ai fenomenului studiat, deoarece predicțiile bazate pe corelație sunt probabil mai fiabile și mai apropiate de realitate.

În ciuda coevoluției a *M. tuberculosis* (MTB) și a oamenilor de-a lungul secolelor și a studiilor intensive de-a lungul deceniilor, parametrii imuni și corelația lor cu alți indicatori de protecție împotriva *M. tuberculosis* încă rămân să fie pe deplin determinați. Cu cât înțelegem mai bine compoziția de bază, amploarea, momentul apariției și distribuția răspunsurilor imune împotriva *M. tuberculosis*, cu atât ne vom apropia mai mult de reducerea poverii formelor grave și a impactului asupra sănătății umane cauzat de tuberculoză la nivel mondial [10].

Un test funcțional care caracterizează activitatea componentei celulare a imunității este evaluarea activității proliferative a limfocitelor ca răspuns la mitogeni și antigene specifice [11].

Activarea limfocitelor sub influența fitohemaglutininei i-a permis cercetătorului Knight S. (1960) să dezvolte reacția de transformare a blastelor limfocitare în 1960 specifice [21]. Evaluarea răspunsului proliferativ al limfocitelor utilizând reacția de transformare a blastelor limfocitare

(LBTR) cu fitohemaglutinină este indicată pentru o caracterizare completă a stării sistemului imunitar al pacienților, pentru a diagnostica supresia sau hiperactivarea răspunsului imun în perioada acută a infecțiilor, în diagnosticarea cauzelor stărilor de imunodeficiență secundară, precum și pentru a evalua adecvarea răspunsului clonelor limfocitare specifice la un exoantigen [17, 6].

Limfocitele mici care circulă în sângele periferic răspund la un stimul antigenic specific cu o proliferare intensă. Limfocitele T mature migrează din timus prin fluxul sanguin către organele limfoide secundare, unde are loc faza dependentă de antigen a diferențierii celulelor T. Aici, ca răspuns la stimulul antigenic, limfocitele T sunt activate și proliferază, cu expansiunea preferențială a clonei de celule care posedă receptori pentru antigenul invadator. Acest lucru duce la o creștere bruscă a clonei specifice de limfocite T în zilele 4-5 (răspuns imun primar) sau 3-4 (răspuns imun secundar) după introducerea unui antigen străin în organism [17, 19].

Până în prezent, testul RBTL este utilizat în examinarea pacienților cu patologie imunologică în diverse domenii ale medicinei pentru a detecta sensibilizarea la antigeni (alergeni) - inclusiv tiziologie, reumatologie, imunologie și alergologie - pentru a evalua componenta celulară a imunității și activitatea funcțională a limfocitelor. Reacția este cea mai precisă la pacienții suspecți de hipersensibilitate de tip întârziat [20].

Dezvoltarea infecției depinde de rezistența imună, precum și de capacitatea organismului de a combate stresul oxidativ cauzat de medicamentele antituberculoase și exotoxinele MBT utilizând mecanisme antioxidante. Stresul oxidativ este cauzat de un dezechilibru între producția de radicali liberi și capacitatea sistemului biologic de a detoxifia peroxidii și radicalii liberi. Stresul oxidativ și peroxidarea proteinelor provoacă tulburări metabolice cronice cu fibroză extinsă din cauza acumulării de colagen în țesuturi, ducând la insuficiență multiplă de organe [4].

Patogeneza tuberculozei implică activarea celulelor mieloide, ceea ce promovează formarea de radicali liberi [12]. Cu toate acestea, datorită varietății largi de manifestări clinice, rezultatele infecției cu tuberculoză pot varia de la infecție asimptomatică – infecție tuberculoasă latentă - până la boală pulmonară progresivă severă cu distrugere extinsă a țesutului pulmonar [1, 15]. Atât studiile clinice, cât și cele experimentale pe animale privind tuberculoza au descris leziuni oxidative excesive ale celulelor și țesuturilor, ducând la peroxidarea lipidelor și moartea celulară [13, 2]. Mediul inflamator intens din tuberculoza activă este caracterizat prin acumularea de specii reactive de oxigen, care sunt stimulate în mare măsură de mitocondrii prin intermediul NADPH oxidazei [29, 14].

Tuberculoza fiind o problemă gravă de sănătate globală, metodele actuale de diagnostic necesită optimizate continuu. Metabolomica este din ce în ce mai utilizată în studiul bolilor infecțioase. Cho Y. și colab. (2020) au efectuat profiluri metabolomice pentru a identifica potențiali biomarkeri la pacienții cu tuberculoză active [5]. Noii biomarkeri serici, cum ar fi glutamatul, sulfoximetionina, aspartatul, glutamina, metionina și asparagina, s-au dovedit a fi potențial utili pentru diagnosticarea suplimentară, rapidă și neinvazivă a tuberculozei pulmonare.

S-a constatat, că pacienții cu recidiva tuberculozei pulmonare au prezentat un dezechilibru între peroxidarea lipidică crescută și capacitatea de apărare antioxidantă. Echilibrul sistemului inhibitor de proteinaze a fost perturbat. Nivelul total de haptoglobulină a crescut, în timp ce numărul de persoane cu fenotip homozigot 2:2 haptoglobulină a crescut, iar numărul de persoane cu fenotip heterozigot 2:1 a scăzut. Normalizarea parametrilor biochimici la pacienții cu recidive a fost tardive [22].

Markerul PPOA (produse proteice de oxidare avansată) reflectă deteriorarea oxidativă a proteinelor observată la pacienții cu stres oxidativ. Produsele proteice de oxidare avansată (AOPP) sunt toxine uremice care apar în urma interacțiunii oxidanților clorurați (cloramine și acid hipocloros) cu proteinele plasmatică [16].

Pentru a evalua starea sistemului antioxidant, se determină activitatea antioxidantă totală. Aceasta permite identificarea persoanelor cu risc crescut de a dezvolta diverse boli, monitorizarea progresiei bolii și a eficacității terapiei și justificarea utilizării antioxidantilor în tratamentul complex al pacientului. Nivelurile de antioxidanți și asigurarea unei protecții adecvate din partea sistemelor antioxidante sunt esențiale pentru prevenirea stresului oxidativ. Sistemul antioxidant și enzimele sale antioxidante specifice (superoxid dismutaza, catalază), proteinele antioxidante (haptoglobina, ceruloplasmina) inhibă reacțiile de formare a radicalilor liberi.

Scopul studiului.

Studierea caracteristicilor proliferării limfocitelor T sub influența fitohemaglutininei în funcție de indicatorii stresului oxidativ și ai activității antioxidante și legăturile de corelație dintre acești indicatori la pacienții cu recidivă a tuberculozei pulmonare și fără recidivă, în scopul identificării potențialilor biomarkeri ai activității de proliferare a limfocitelor T.

Material și metode.

Studiul a inclus 130 de pacienți, printre care: a) un grup de studiu – 65 de pacienți cu recidivă a tuberculozei pulmonare (TPR) și b) un grup de control – 65 de pacienți cu tuberculoză pulmonară (TB) fără recidivă. Pacienții au fost asociați între ei folosind metoda perechilor. Studiul a inclus, de asemenea, persoane sănătoase de același gen și vârstă ca și cele din grupurile de studiu. Pacienții au fost examinați înainte de tratament pentru următorii parametri imunologici și biochimici: 1) leucogramă; 2) reacția de transformare blastică a limfocitelor cu fitohemaglutinină. (Ghinda S.S., 1982) [18]; 3) intensitatea stresului oxidativ a fost analizată prin determinarea concentrației producătoarelor proteice de oxidare avansată (AOPP) conform procedurii descris de Witko-Sarsat V. [16].); 4) dozarea dialdehidei malonice (DAM), dozarea superoxide dismutazei (SOD), dozarea catalazei, dozarea ceruloplasminei a fost efectuată conform procedurii descris de Cudumac V. et al., (2010) [7]; 5) dozarea activității antioxidante totale (tAOA) s-a efectuat prin metoda bazată pe degradarea radicalului 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolină 6 sulfonat (ABTS) la interacțiunea cu compușii serici cu proprietăți antioxidante și măsurarea descreșterii absorbanței la 734 nm [8]. 6) prin metoda CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity), bazată pe capacitatea de reducere a ionului de Cu prin captarea radicalului hidroxil [3].

Datele obținute au fost procesate prin testul t-Student, variație alternativă, corelație și prezentate în tabele.

Rezultate și discuții.

În fiecare grup au fost examinați a câte 65 de pacienți, din care 16 femei și 45 de bărbați. 54 de pacienți cu tuberculoză pulmonară infiltrativă și 5 pacienți cu tuberculoză pulmonară diseminată, 3 pacienți cu tuberculoză pulmonară fibro-cavitară și 3 pacienți cu tuberculoză pulmonară nodulară. Pacienții nu au prezentat diferențe de vârstă, vârsta medie a pacienților cu recidivă a tuberculozei a fost de $42,7 \pm 1,63$ ani, iar la pacienții cu tuberculoză pulmonară – $44,3 \pm 1,83$. Durata medie a spitalizării la pacienții cu recidivă a tuberculozei a fost de $95,4 \pm 7,45$ zile-pat, iar la pacienții cu tuberculoză pulmonară – $65,8 \pm 3,80$ zile-pat ($p < 0,01$). Durata medie a eliminării de *M. tuberculosis* la pacienții cu recidivă a tuberculozei a fost de $72,0 \pm 7,73$ zile, în timp ce la pacienții cu tuberculoză pulmonară a fost de $48,7 \pm 3,26$ zile ($p < 0,05$). Prin urmare, pacienții cu recidivă a tuberculozei au avut o perioadă de eliminare a *M. tuberculosis* mai lungă decât pacienții cu tuberculoză pulmonară fără recidivă.

Numărul de leucocite (tab. 1) la ambele grupuri de pacienți a fost semnificativ mai mare decât la persoanele sănătoase ($p < 0,001$ în ambele cazuri), iar numărul de leucocite a fost mai mare la pacienții

cu recidivă a tuberculozei pulmonare comparativ cu grupul de pacienți fără recidivă ($p < 0,05$). Numărul de neutrofile segmentate a fost semnificativ mai mic la pacienții cu tuberculoză pulmonară decât la persoanele sănătoase ($p < 0,001$) și la pacienții cu recidivă a tuberculozei pulmonare ($p < 0,05$). Numărul de neutrofile segmentate a fost semnificativ mai mare la pacienții cu recidivă a tuberculozei pulmonare decât la persoanele sănătoase ($p < 0,01$) și nu s-a constatat diferență semnificativă între grupuri. Numărul de limfocite la pacienții cu recidivă de tuberculoză a fost semnificativ mai mic decât la persoanele sănătoase ($p < 0,05$) și nu s-a constatat diferență semnificativă între grupuri. Astfel, pacienții cu recidivă a tuberculozei pulmonare se caracterizează printr-o scădere marcată a limfocitelor și o deplasare spre stânga a formulei leucocitare.

Proliferarea limfocitelor (tab. 2) la ambele grupuri de pacienți a fost semnificativ mai mare decât la subiecții sănătoși ($p < 0,001$ în ambele cazuri), iar conținutul de limfocite transformate a fost mai înalt la pacienții cu recidivă a tuberculozei pulmonare decât la pacienții fără recidivă ($p < 0,05$). Markerul AOPP (advanced oxidation protein products) reflectă deteriorarea oxidativă a proteinelor observată la pacienții cu stres oxidative. Gradul de deteriorare oxidativă a proteinelor (AOPP) la pacienții cu recidivă a tuberculozei pulmonare a fost semnificativ mai mare

Tabelul 1.

Unii indicatori ai formulei leucocitare la examinați

Indicii studiați	Sănătoși (n-100)	TBR (n-65)	TB (n-65)
Leucocite (x10 ⁹ /l)	6,0±0,12	9,6±0,62□	7,9±0,28□●
N. segmentate (%)	65,3±0,33	63,4±1,70	56,6±1,25●
N. nesegmentate (%)	1,8±0,11	2,3±0,41□	1,8±0,38●
Limfocite (%)	25,6±0,39	22,1±1,21□	26,9±1,08●

Nota: □ – diferență semnificativă între sănătoși și bolnavi; ● - diferență semnificativă între grupurile de bolnavi

Tabelul 2.

Indicii de proliferare a limfocitelor în funcție de producția de AOPP, DAM

Indicii studiați	Sănătoși (n-100)	TBR (n-65)	TB (n-65)
RBTL (%)	78,4±0,72	55,4±1,32□	64,4±0,71□●
AOPP (μM/L)	25,6±0,39	45,0±2,86□	26,1±1,08●
Corelația - RBTL↔ AOPP (u.c.)		0,65	0,62
DAM (μM/L)	12,8±0,57	23,7±1,39□	12,1±0,63●
Corelația - RBTL↔ DAM (u.c.)		0,86	0,62

Nota: □ – diferență semnificativă între sănătoși și bolnavi; ● - diferență semnificativă între grupurile de bolnavi.

Coeficientul de corelație Pearson a fost determinat pentru a determina puterea corelației dintre indicatorii studiați.

Interpretarea puterii corelației: r 0,1–0,29 indică o corelație foarte slabă; r 0,3–0,49 indică o corelație slabă; r 0,5–0,69 indică o corelație moderată; iar r 0,7 și peste indică o corelație puternică.

decât la subiecții sănătoși ($p < 0,001$). În consecință, cu cât gradul de deteriorare oxidativă a proteinelor este mai mare, cu atât indicele de proliferare a limfocitelor este mai mic. S-a stabilit o corelație moderată ($r = 0,65$) între indicii (RBTL↔AOPP) de proliferare a limfocitelor și deteriorare oxidativă a proteinelor la pacienții cu recidivă a tuberculozei pulmonare. La pacienții cu tuberculoză pulmonară, s-a stabilit, de asemenea, o corelație moderată între indicatorii de proliferare a limfocitelor și deteriorare oxidativă a proteinelor ($r = 0,62$).

Cel mai informativ indicator al stresului oxidativ este dialdehida malonică (DAM), care reflectă susceptibilitatea lipoproteinelor la oxidare. Gradul de susceptibilitate a lipoproteinelor la oxidare la pacienții cu recidivă tuberculozei pulmonare a fost semnificativ mai mare în comparație cu sănătoșii ($p < 0,001$), în timp ce la pacienții cu tuberculoză pulmonară nu a diferenciat semnificativ de indicatorul sănătoșilor. În consecință, cu cât susceptibilitatea lipoproteinelor la oxidare este mai mare, cu atât indicele de proliferare a limfocitelor este mai mic. S-a stabilit o corelație puternică ($r = 0,86$) între indicatorii (RBTL↔DAM) de proliferare a limfocitelor și gradul de susceptibilitate a lipoproteinelor la oxidare la pacienții cu recidivă tuberculozei pulmonare, în timp ce o corelație moderată ($r = 0,61$) a fost stabilită la pacienții cu tuberculoză pulmonară.

În consecință, la pacienții cu recidivă a tuberculozei pulmonare, o predispoziție semnificativ mai mare a lipoproteinelor la oxidare și un grad moderat de deteriorare oxidativă a proteinelor, ceea ce reflectă un grad ridicat de stres oxidativ și este confirmat, în funcție de puterea corelației. Aici putem concluziona că dialdehida malonică (DAM) poate fi un potențial biomarker al indicatorilor suprimați ai proliferării limfocitelor.

Sistemul antioxidant (AOS) și enzimele sale antioxidante specifice (superoxide dismutaza, catalază), proteine antioxidante (haptoglobină, ceruloplasmină) inhibă formarea radicalilor liberi. Proliferarea limfocitelor (tab. 3) la ambele grupuri de pacienți a fost semnificativ mai mare decât la grupul sănătos ($p < 0,001$ în ambele cazuri), iar pacienții cu recidivă a tuberculozei pulmonare au fost mai mari decât la pacienții fără recidivă ($p < 0,05$).

Activitatea antioxidantă totală, determinată de metoda ABTS la pacienții din ambele grupuri, a fost semnificativ mai mare (tab. 3) decât la cei sănătoși ($p < 0,05$) și nu au existat diferențe semnificative între grupurile de pacienți. Între indicatorii de proliferare a limfocitelor și activității antioxidante totale (RBTL↔ABTS) la pacienții cu recidivă a tuberculozei pulmonare, s-a stabilit corelație moderată ($r = 0,66$), iar la pacienții cu tuberculoză pulmonară a fost stabilită corelație slabă ($r = 0,48$).

Activitatea antioxidantă totală, determinate prin metoda CUPRAC la pacienții cu tuberculoză pulmonară a fost semnificativ mai înaltă în comparație cu sănătoșii ($p < 0,001$), la pacienții cu recidivă a tuberculozei pulmonare, s-a determinat o creștere semnificativă a activității antioxidante totale ($p < 0,001$), în comparație cu sănătoșii și cu pacienții cu tuberculoză pulmonară ($p < 0,01$). Între indicatorii de proliferare a limfocitelor și a activității antioxidante totale (RBTL↔CUPRAC) la pacienții cu recidivă a tuberculozei pulmonare, a fost stabilită o corelație moderată ($r = 0,61$), și la pacienții cu tuberculoză pulmonară a fost, de asemenea, o corelație moderată ($r = 0,64$).

Prin urmare, pacienții cu recidivă a tuberculozei pulmonare au prezentat o activitate antioxidantă totală semnificativ mai scăzută, determinată prin metodele ABTS și CUPRAC, reflectând suprimarea activității

Tabelul 3.

Indicatori ai proliferării limfocitelor în funcție de indicatorii activității generale antioxidante (metoda ABTS, metoda CUPRAC)

Indicii studiați	Sănătoși (n-100)	TBR (n-65)	TB (n-65)
RBTL (%)	78,4±0,72	55,4±1,32□	64,4±0,71□●
Metoda ABTS (mmol/L)	0,47±0,02	0,57±0,030□●	0,55±0,023□
Corelația - RBTL↔ABTS (u.c.)		0,66	0,48
Metoda CUPRAC (mmol/L)	1,17±0,037	1,39±0,124●	2,65±0,180□
Corelația- RBTL↔CUPRAC (u.c.)		0,61	0,64

Nota: □ – diferență semnificativă între sănătoși și bolnavi; ● - diferență semnificativă între grupurile de bolnavi.

Coeficientul de corelație Pearson a fost determinat pentru a determina puterea corelației dintre indicatorii studiați.

Interpretarea puterii corelației: r 0,1–0,29 indică o corelație foarte slabă; r 0,3–0,49 indică o corelație slabă; r 0,5–0,69 indică o corelație moderată; iar r 0,7 și peste indică o corelație puternică.

antioxidante totale și confirmată de intensitatea corelației. Se poate concluziona, că activitatea antioxidantă totală, determinată prin metodele CUPRAC și ABTS, nu poate fi un biomarker potențial al proliferării limfocitelor suprimate la acești pacienți, din cauza intensității scăzute a corelației.

Proliferarea limfocitelor (Tabelul 4) la ambele grupuri de pacienți a fost semnificativ mai mare decât la grupul de control sănătos ($p < 0,001$ în ambele cazuri), iar conținutul de limfocite transformate a fost mai mare la pacienții cu tuberculoză pulmonară recidivată decât la pacienții fără recidivă ($p < 0,05$).

Activitatea enzimei antioxidante superoxid dismutaza (SOD) la pacienții din ambele grupuri (tab. 4) a fost semnificativ mai joasă decât la subiecții sănătoși ($p < 0,001$), iar la pacienții cu recidivă a tuberculozei pulmonare s-a observat o scădere mai pronunțată și mai sigură a activității enzimei superoxid dismutază ($p < 0,01$) în comparație cu pacienții cu tuberculoză. O corelație puternică ($r = 0,86$) a fost stabilită între indicii de proliferare limfocitară și activitatea antioxidantă a enzimei superoxid dismutază (RBTL↔SOD) la pacienții

cu recidivă de tuberculoză pulmonară și o corelație moderată ($r = 0,63$) a fost stabilită la pacienții cu tuberculoză pulmonară.

Activitatea enzimei antioxidante catalaze la pacienții din ambele grupuri (tab. 4) nu a diferit semnificativ de cea a subiecților sănătoși. S-a observat o diferență semnificativă între parametrii din grupul de bază de pacienți și din grupul de control. S-a constatat o corelație puternică ($r = 0,89$) între parametrii proliferării limfocitelor și activitatea antioxidantă a enzimei catalaze (RBTL ↔ CAT) la pacienții cu recidivă a tuberculozei pulmonare, în timp ce la pacienții cu tuberculoză pulmonară s-a constatat o corelație slabă ($r = 0,42$).

În consecință, pacienții cu recidivă a tuberculozei pulmonare au avut o activitate semnificativ mai scăzută a superoxid dismutazei, reflectând suprimarea activității antioxidante a enzimei și confirmată de puterea corelației (0,86). Astfel, activitatea antioxidantă a superoxid dismutazei poate fi un potențial biomarker al parametrilor suprimați ai proliferării limfocitelor la acești pacienți, datorită puterii mari a corelației.

Tabelul 4.

Indicii de proliferare a limfocitelor în funcție de indicii de activitate ai enzimelor antioxidante (superoxiddismutază – SOD și catalază – CAT) și corelația între indici

Indicii studiați	Sănătoși (n-100)	TBR (n-65)	TB (n-65)
RBTL (%)	78,4±0,72	55,4±1,32□	64,4±0,71□●
Superoxiddismutază	779,4±76,62	382,8±30,6●□	586,3±33,8□
Corelația - RBTL↔SOD (u.c.)		0,86	0,63
Catalaza (μM/L)	10,3±0,34	11,4±0,59●□	10,0±0,31
Corelația - RBTL↔CAT (u.c.)		0,89	0,42

Nota: □ – diferență semnificativă între sănătoși și bolnavi; ● - diferență semnificativă între grupurile de bolnavi.

Coeficientul de corelație Pearson a fost determinat pentru a identifica puterea corelației dintre indicatorii studiați.

Interpretarea puterii corelației: la r 0,1-0,29 – corelație foarte slabă, la r 0,3-0,49 – corelație slabă; la r 0,5-0,69 – corelație moderată; la r 0,7 și peste – corelație puternică.

Tabelul 5.

Indicii de proliferare a limfocitelor în funcție de indicii de activitate ai proteinelor antioxidante (haptoglobină – HPT și ceruloplasmină – CER)

Indicii studiați	Sănătoși (n-100)	TBR (n-65)	TB (n-65)
RBTL (%)	78,4±0,72	55,4±1,32□	64,4±0,71□●
Haptoglobină (g/L)	1,08±0,056	1,76±0,063□	1,18±0,044●
Corelația - RBTL↔HPT (u.c.)		0,60	0,40
Ceruloplasmină (g/L)	0,36±0,021	0,93±0,037□	0,50±0,033□●
Corelația - RBTL↔CER (u.c.)		0,56	0,35

Notă: □ – diferență semnificativă între sănătoși și bolnavi; ● - diferență semnificativă între grupurile de bolnavi.

Coeficientul de corelație Pearson a fost determinat pentru a determina puterea corelației dintre indicatorii studiați.

Interpretarea puterii corelației: r 0,1-0,29 indică o corelație foarte slabă; r 0,3-0,49 indică o corelație slabă; r 0,5-0,69 indică o corelație moderată; iar r 0,7 și peste indică o corelație puternică.

Activitatea proteinei antioxidante haptoglobină (HPT) la pacienții din ambele grupuri (tab. 5) a fost semnificativ mai mare decât la subiecții sănătoși ($p < 0,001$), iar la pacienții cu recidivă a tuberculozei pulmonare s-a observat o creștere mai pronunțată și mai sigură a activității proteinei haptoglobină ($p < 0,01$) în comparație cu pacienții cu tuberculoză pulmonară. O corelație moderată ($r = 0,60$) a fost stabilită între indicii de proliferare a limfocitelor și activitatea antioxidantă a proteinei haptoglobină (RBTL ↔ HPT) la pacienții cu recidivă a tuberculozei pulmonare, în timp ce o corelație slabă ($r = 0,40$) a fost stabilită la pacienții cu tuberculoză pulmonară. Activitatea proteinei antioxidante ceruloplasmină (CER) la pacienții din ambele grupuri (tab. 5) a fost semnificativ mai mare decât la subiecții sănătoși ($p < 0,01$), iar la pacienții cu recidivă a tuberculozei pulmonare s-a observat o creștere mai pronunțată și mai sigură a activității proteinei ceruloplasmină ($p < 0,05$) în comparație cu pacienții cu tuberculoză pulmonară. O corelație moderată ($r = 0,56$) a fost stabilită între indicii proliferării limfocitare și activitatea antioxidantă a proteinei ceruloplasmină (RBTL ↔ CER) la pacienții cu recidivă a tuberculozei pulmonare, iar o corelație slabă ($r = 0,35$) a fost stabilită la pacienții cu tuberculoză pulmonară.

Așadar, activitatea antioxidantă a haptoglobinei și ceruloplasminei nu poate fi un biomarker potențial al indicilor de proliferare limfocitară suprimați la astfel de pacienți, din cauza intensității slabe a corelației.

Concluzii.

1. Proliferarea limfocitelor la ambele grupuri de pacienți a fost semnificativ mai mică decât la grupul de control sănătos ($p < 0,001$ în ambele cazuri), iar nivelul limfocitelor transformate la pacienții cu recidivă a tuberculozei pulmonare a fost chiar mai mic decât la pacienții fără recidivă ($p < 0,05$).

2. La pacienții cu recidivă a tuberculozei pulmonare, gradul de deteriorare oxidativă a proteinelor și susceptibilitatea lipoproteinelor la oxidare, măsurate prin markerul AOPP și indicatorul de stres oxidativ malondialdehidă (DAM), cresc semnificativ. Acest lucru indică faptul că acești pacienți prezintă reacții de stres oxidativ mai severe decât pacienții cu tuberculoză pulmonară.

3. Activitatea antioxidantă totală, determinată prin metodele ABTS și CUPRAC, a fost semnificativ mai mică la cazurile cu recidivă a tuberculozei pulmonare, reflectând suprimarea activității antioxidante totale.

4. Activitatea superoxid dismutazei (SOD) a fost semnificativ mai mică la pacienții cu recidivă a tuberculozei pulmonare, reflectând suprimarea activității antioxidante. Pacienții cu tuberculoză

pulmonară recidivată au prezentat o creștere mai pronunțată și mai sigură a activității haptoglobinei și ceruloplasminei în comparație cu pacienții cu tuberculoză pulmonară.

5. Malondialdehida (DAM) și activitatea enzimatică a superoxid dismutazei și catalazei pot fi potențiali biomarkeri ai proliferării limfocitelor suprimate datorită unei corelații puternice.

Bibliografie.

1. Amaral E.P., Conceicao E.L., Costa D.L., Rocha M.S., Marinho J.M. Cordeiro-Santos M, et al. *N-acetylcysteine exhibits potent anti-mycobacterial activity in addition to its known anti-oxidative functions*. BMC Microbiol (2016) 16(1):251.
2. Amaral E.P., Lasunskaja E.B., D'Imperio-Lima M.R. *Innate immunity in tuberculosis: how the sensing of mycobacteria and tissue damage modulates macrophage death*. Microbes Infect (2016-a) 18(1):11–20.
3. Apak R., Güçlü K., Özyürek M. et al. *Total antioxidant capacity assay of human serum using copper (II)-neocuproine as chromogenic oxidant: the CUPRAC method*. Free Radical Res., 2005; 39 (9): 949-961.
4. Birben E., Sahiner U., Sackesen C. et al. *Oxidative stress and antioxidant defense*. World Allergy Organ J., 2012; 5 (1): 9-19.
5. Cho Y., Park Y., Sim B. et al. *Identification of serum biomarkers for active pulmonary tuberculosis using a targeted metabolomics approach*. Sci Rep 10, 3825 (2020).
6. Di Rosa F., Cossarizza A., Hayday A.C. To Ki or Not to Ki: *Re-Evaluating the Use and Potentials of Ki-67 for T Cell Analysis*. Front. Immunol. 2021; 12:653974.
7. Cudumac V., Tagadiuc O., Rîvneac V., Sardari V., Pantea V., Andronache L., Știrba O. *Investigații biochimice. Chișinău, 2010, - Dozarea dialdehidei malonice (DAM) - Dozarea superoxid dismutazei (SOD) - Dozarea catalazei - Dozarea ceruloplasminei - Dozarea proteinelor totale (după Lowry).*, (2010), 97 p.
8. Gudumac V., Rîvneac V., Tagadiuc O. et al. *Metode de cercetare a metabolismului hepatic*. Elaborare metodică USMF „Nicolae Testemițanu”. Tipografia „Tehnică-Info”. Chișinău, 2012; 162 p.
9. Lambeth JD. *NOX enzymes and the biology of reactive oxygen*. Nat Rev Immunol (2004) 4(3):181–9.
10. Larsen S.E., Williams B.D., Rais M., Coler R.N., Baldwin S.L. (2022) *It Takes a Village: The Multifaceted Immune Response to Mycobacterium tuberculosis Infection and Vaccine-Induced Immunity*. Front. Immunol. 13:840225.
11. Marits P., Wikström A.C., Popadic D., et al. *Evaluation of T and B lymphocyte function in clinical practice using a flow cytometry based proliferation assay*. Clin. Immunol. 2014; 153(2): 332-342.
12. Orme I.M., Robinson R.T., Cooper A.M. *The balance between protective and pathogenic immune responses in the TB-infected lung*. Nat Immunol (2015) 16(1):57–63.

13. Palanisamy G.S., Kirk N.M., Ackart D.F., Shanley C.A., Orme I.M., Basaraba R.J. *Evidence for oxidative stress and defective antioxidant response in guinea pigs with tuberculosis*. PLoS One (2011) 6(10):e26254.
14. Rockwood N., Costa D.L., Amaral E.P., Du Bruyn E., Kubler A., Gil-Santana L., Fukutani K.F., Scanga C.A., Flynn J.L., Jackson S.H., Wilkinson K.A., Bishai W.R., Sher A., Wilkinson R.J. and Andrade V.B. *Mycobacterium tuberculosis Induction of Heme Oxygenase-1 Expression Is Dependent on Oxidative Stress and Reflects Treatment Outcomes*. Front. Immunol.. 2017, 8:542.
15. Salgame P., Geadas C., Collins L., Jones-Lopez E., Ellner J.J. *Latent tuberculosis infection – revisiting and revising concepts*. Tuberculosis (Edinb) (2015) 95(4):373–84.
16. Witko-Sarsat V., Friedlander M., Capeillère-Blandin C. et al. *Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia*. Kidney Int., 1996; 49 (5): 1304-1313.
17. Бычкова Н.В. *Проточная цитометрия в оценке функциональной активности клеток иммунной системы в норме и при иммунозависимых заболеваниях (клинико-экспериментальное исследование)*. Дисс. д.б.н., Санкт-Петербург, 2022, 287 с.
18. Гинда С.С. *Модификация микрометода реакции бласттрансформации лимфоцитов*. Лабораторное дело. – 1982. – № 8. – С. 23–25.
19. Лебедев К.А. *Иммунология в клинической практике*. 1996, 397 с. Издательство «Электронная медицинская книга»).
20. Манина И.В., Сергеев В.Ю., Голубцова Н.В., Сергеев А.Ю. *Модификация реакции бласттрансформации лимфоцитов для применения в аллергологической практике*. Российский биотерапевтический журнал. 2'2018, том 17. С. 88-92. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-88-92
21. Найт С. *Анализ пролиферации лимфоцитов / Лимфоциты. Методы: Пер. с англ. / Под. ред. Дж. Клауса*. – М.: Мир, 1960, стр. 286-310.
22. Характер Ж.З., Мажак К.Д., Павленко А. В., Скорая Р.И., Плато И.Л. *Изменения биохимических показателей у пациентов с рецидивом туберкулеза легких*. Врач Дело. 1990, Май;(5):71-2.