

В. П. Шаповалов
РОЛЬ ЦИТОКІНІВ У ЛОКАЛЬНІЙ РЕГУЛЯЦІЇ СПЕЦИФІЧНОГО ЗАПАЛЕННЯ
У ХВОРИХ НА ДЕСТРУКТИВНИЙ ТУБЕРКУЛЬОЗ ЛЕГЕНЬ

Буковинський державний медичний університет

Відомо, що у хворих на легеневий туберкульоз формується вторинний імунodefіцитний стан, який перебігає за двома типами [3]. Перший тип характеризується відносним зниженням кількості Т-лімфоцитів або їх субпопуляцій, другий — наявністю абсолютної Т-лімфоцитопенії або зниженої мітоген-індукованої проліферації Т-клітин та секреції ІЛ-2. Зазвичай переважає перший тип, але при подальшому прогресуванні захворювання нестача факторів імунного захисту набуває ознак другого типу, що супроводжується зменшенням продукції ІЛ-2 та помірним зниженням синтезу ІЛ-1 β за підсилення генерації TNF- α [2, 5].

Мета роботи. Встановити зміни локальної секреції інтерлейкіну-1бета (ІЛ-1 β), фактора некрозу пухлин-альфа (TNF- α), інтерферону-гама (ІFN- γ) та трансформуючого фактору росту — бета1 (TGF- β_1) в різні фази туберкульозного запалення шляхом дослідження вмісту цитокінів у кріоконденсованому експіраті.

Матеріал і методи дослідження

Обстежено 41 хворого з вперше виявленим інфільтративним і дисемінованим туберкульозом легень у фазі розпаду. Контрольну групу склали 10 практично здорових волонтерів. Інфільтративний туберкульоз легень діагностовано у більшості хворих (70 %). Першу групу за клініко-рентгенологічними ознаками склали 21 хворий в ексудативно-некротичній фазі туберкульозного процесу, другу — 20 пацієнтів в продуктивно-некротичній фазі туберкульозу легень. Вік пацієнтів коливався від 17 до 59 років. Серед них чоловіки склали майже 70 %. Деструктивний процес супроводжувався бактеріовиділенням, у тому числі масивним — у 60 % випадків. Первинна резистентність до антимікобактеріальних препаратів (АМБП) була зареєстрована у 8 пацієнтів (16,4 %): з нечутливими мікобактеріями туберкульозу (МБТ) до стрептоміцину — 4 випадки, ізоніазиду — 3, рифампіцину -1; з подвійною резистентністю МБТ до АМБП — 3. Супутні захворювання й ускладнення туберкульозу легень спостерігалися у 23 % обстежених хворих. У всіх пацієнтів спостерігався інтоксикаційний синдром (від слабкого до помірно вираженого). Термін госпіталізації хворих до початку обстеження не перевищував двох діб.

Накопичення кріоконденсованого експірату визначалося за методикою Г. І. Сидоренка (1981) на апараті власної конструкції, стандартизованого за розмірами, температурним режимом, часовими параметрами, волюмометрією.

Дослідження вмісту цитокінів у конденсаті видихуваного повітря проводили на імуноферментному аналізаторі "Уніплан-М" (Росія) за допомогою наборів реагентів для імуноферментного аналізу: інтерлейкіна-1 β — "Pgo-Con IL-1 β ", трансформуючого фактору росту- α — "Pgo-Con TNF- α " (ООО "Протеиновый контур", Росія), інтерферону- γ — "IFN γ ELISA KIT" фірми "DIACLONE Res." (США), трансформуючого фактору росту- β_1 — "TGF β_1 ELISA KIT" фірми "DRG Instruments GmbH" (Німеччина).

Результати досліджень опрацьовували методами варіаційного статистичного аналізу з визначенням критерію Стюдента за програмою "Biostat" на РС -PENTIUM II.

Результати дослідження та їх обговорення

Наведені у табл. 1 дані свідчать, що в ексудативну фазу туберкульозного запалення концентрації в експіраті прозапальних цитокінів ІЛ-1 β і TNF- α перевищували контрольні величини в 3,3 рази ($p < 0,01$), ІFN- γ — в 2,4 рази ($p < 0,05$), тоді як концентрація TGF- β_1 не змінювалася і при порівнянні з продуктивною фазою була меншою у 5,3 рази ($p < 0,001$). У продуктивну фазу туберкульозного запалення рівень в експіраті ІЛ-1 β виявлявся на 33,3 % меншим за контроль ($p < 0,05$), концентрація TNF- α не відрізнялась від контрольних показників ($p > 0,05$), а концентрація ІFN- γ і TGF- β_1 перевищували таку у осіб контрольної групи в 2,3 та 4,9 рази відповідно ($p < 0,01$).

Серед вірогідних міжгрупових різниць варто звернути увагу на значне переважання в експіраті вмісту ІЛ-1 β і TNF- α ($p < 0,001$) в ексудативній фазі туберкульозного запалення, тоді як у продуктивній фазі суттєво превалювала концентрація TGF- β_1 ($p < 0,001$).

Раніше нами встановлено, що в ексудативно-некротичну фазу туберкульозного запалення в експіраті значно зростає вміст дієнових кон'югатів і малонового альдегіду, тоді як продуктивно-некротична фаза характеризується суттєво меншим рівнем продуктів перекисного окиснення ліпідів [1], що може бути непрямим свідченням відповідної активації або пригнічення функціональної активності альвеолярних макрофагів (МФ) та/або високої чи низької інтенсивності специфічного запального процесу.

Інтегруючим показником взаємодії молекулярних медіаторів запалення, які визначають фазовий перебіг специфічної тканинної запальної регуляції процесу, є баланс цитокінів, що віддзеркалює універсальні імунологічні механізми боротьби з внутрішньоклітинним збудником.

На першому етапі реалізації клітинної імунної відповіді патогенний чинник захоплюється макрофагами (МФ), які руйнують мікобактерії у фаголізосомах і презентують їх антигени у складі головного комплексу гістосумісності (МНС) 2 класу CD4 $^{+}$ Т-клітинам. Процес супроводжується виділенням макрофагами ІЛ-12, який активує NK-клітини і стимулює їх до генерації ІFN- γ . Це знаходить підтвердження і в наших дослідженнях, на що вказує зростання в експіраті рівня ІFN- γ як у ексудативну, так і продуктивну фазу запалення.

Антиген у складі МНС 2 класу, разом з ІЛ-12 та ІFN- γ спонукає примітивні CD4 $^{+}$ Т-лімфоцити до перетворення у Th 1 клітини. Останні виділяють ІЛ-2, який стимулює проліферацію CD8 $^{+}$ цитотоксичних лімфоцитів, а також ІFN- γ , що активує МФ. Як МФ, так і CD4 $^{+}$ та CD8 $^{+}$ -Т-лімфоцити володіють здатністю продукувати й інші цитокіни, зокрема, TNF- α та ІЛ-1 β із відомими локальними та системними ефектами, що також підтверджено нашими дослідженнями щодо зростання концентрації цих цитокінів в ексудативній фазі туберкульозного запалення.

Маркерним прозапальним цитокіном, що приймає участь у сукупній реакції на МБТ, є ІЛ-1 β [4]. У хворих на

Таблиця 1

Концентрації цитокінів (IL-1 β , TNF- α , IF- γ , TGF- β_1) в експіраті хворих на вперше діагностований деструктивний туберкульоз легень при продуктивній і ексудативній фазі специфічного запалення ($x \pm Sx$)

Групи хворих	Фаза запалення	Вміст цитокінів			
		IL-1 β (pg/ml) n=10	TNF- α (pg/ml) n=10	IF- γ (pg/ml) n=10	TGF- β_1 (pg/ml) n=10
Група контролю		33,9 $\pm$ 3,5	33,4 $\pm$ 4,6	28,3 $\pm$ 3,6	19,2 $\pm$ 3,2
Група 1	Ексудативна	109,41 $\pm$ 11,81 p<0,01 p ₂ <0,01	110,8 $\pm$ 7,48 p<0,001 p ₂ <0,01	67,4 $\pm$ 10,01 p<0,05	17,55 $\pm$ 2,84
Група 2	Продуктивна	22,6 $\pm$ 3,4 p ₁ <0,05	29,8 $\pm$ 4,0	69,2 $\pm$ 10,90 p ₁ <0,01	93,2 $\pm$ 13,4 p ₁ <0,01 p ₂ <0,01

Примітки: p — вірогідність різниць показників рівня цитокінів у експіраті основної групи хворих в ексудативній фазі специфічного запалення (1) по відношенню до контролю;

p₁ — вірогідність різниць показників рівня цитокінів в експіраті групи хворих у продуктивній фазі специфічного запалення (2) по відношенню до контролю;

p₂ — вірогідність різниць показників рівня цитокінів в експіраті між фазами специфічного запалення (групи 1–2).

туберкульоз рівень IL-1 β зростає як системно [4], так і в ділянці вторгнення мікобактерій [9]. Експериментально доведено, що дефіцит IL-1 β сприяє розмноженню збудника туберкульозу внаслідок дефектів утворення гранульом [6].

Ще одним прозапальним цитокіном вважається TNF- α , що має здатність знищувати хронічно інфіковані МФ, які не здатні до ефективного перетравлення захоплених МБТ, а CD8⁺ Т-лімфоцити викликають загибель інфікованих МФ, зокрема, шляхом ініціювання апоптозу [4, 5]. Водночас, активація макрофагів IFN- γ дозволяє їм завершувати процес фагоцитозу МБТ. Окрім того, паралельно індукується синтез імуносупресору TGF- β_1 , який обмежує запалення, започатковує фіброзогенез та ініціює проліферативну стадію процесу, що встановлено в наших дослідженнях у продуктивну фазу специфічного запалення [5].

Стимуляція макрофагів антигенами МБТ підсилює продукцію прозапального TNF- α . Останній приймає участь у формуванні гранулом, сприяючи тим самим локалізації МБТ, оскільки у хворих на туберкульоз генерація TNF- α збільшується саме в ділянці локалізації хвороби [6]. В експерименті застосування моноклональних антитіл проти TNF- α призводить до реактивації туберкульозу, включаючи міліарні і позалегенові форми хвороби [7].

Захисна роль інтерферону- γ (IFN- γ) при туберкульозі добре відома переважно у контексті антигенспецифічного Т-клітинного імунітету [4]. Специфічно індукована продукція IFN- γ антигеном МБТ *in vitro* є сурогатним маркером туберкульозної інфекції [10]. Стимульовані МБТ моноцити активують продукцію лімфоцитами IFN- γ *in vitro*, а природні кілери (NK-клітини) здатні збільшувати продукцію IFN- γ у відповідь на пряму стимуляцію мікобактеріальними олігодезоксинуклеотидами. Легеневі МФ також збільшують його утворення при туберкульозі. Окрім того, IFN- γ генерують Т-клітини, які експресують β -рецептори і здатні самостійно розпізнавати невеликі мікобактеріальні протеїни та небілкові ліганди навіть за відсутності антигенпрезентуючих клітин [10]. В експерименті первинний контакт з МБТ істотно збільшує у регіональних лімфовузлах кількість $\gamma\delta$ -Т-клітин, які, окрім того, накопичуються *in loco morbi*, що сприяє ранній локалізації туберкульозного збудника. Лімфоцити з фенотипом CD3⁺

CD1⁺ реагують з ліпідними або гліколіпідними антигенами МБТ у присутності антигенпрезентуючих клітин [10] CD3⁺ та CD1⁺ клітини хворих на туберкульоз і взаємодіють із CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺, CD8⁺-лімфоцитами, а $\gamma\delta$ -Т-клітинами виявляють цитотоксичну активність, що є необхідним для лімфоцитарної продукції IFN- γ [10].

Водночас мікобактеріальні продукти індукують синтез TGF- β_1 моноцитами і дендритними клітинами. Цікаво, що специфічний антиген вірулентних МБТ безпосередньо підсилює утворення TGF- β_1 і його рівень суттєво зростає в ділянці локалізації збудника. Проте TGF- β_1 не стимулює, а пригнічує клітинний імунітет — інгібує проліферацію Т-клітин і утворення ними IFN- γ , водночас зменшує синтез прозапальних цитокінів, знижує презентацію антигенів МФ, блокуючи активацію імунокомпетентних клітин. TGF- β_1 при туберкульозі приймає участь в ушкодженні тканин і фіброзогенезі, оскільки є промотором продукції і депозиції макрофагальних колагеназ та синтезу колагенового матриксу фібробластами [5]. Природні інгібітори TGF- β_1 усувають супресивний ефект TGF- β_1 на мононуклеарні хворих на туберкульоз, а також активують інфіковані мікобактеріями МФ [5]. У період протизапальної відповіді TGF- β_1 гальмує синтез IFN- γ [10]. Встановлено в анергічних хворих на туберкульоз присутність конститутивної продукції TGF- β_1 , що викликає дефекти сигнальної трансдукції при стимуляції Т-клітин [5, 10].

Отже, надмірна генерація протизапальних цитокінів TGF- β_1 у зоні специфічного запалення є одним із чинників пригнічення імунної реакції організму на мікобактеріальну інтервенцію і тому потребує відповідної корекції.

Висновки

На фоні гіперпродукції інтерферону- γ в ексудативну фазу специфічного запалення на локальному рівні значно зростає рівень прозапальних цитокінів TNF- α та IL- β , тоді як у продуктивну фазу істотно збільшується концентрація протизапального TGF- β_1 , що супроводжується суттєвим зниженням концентрацій прозапальних цитокінів, особливо IL- β .

Надмірна локальна генерація TGF- β_1 у продуктивній фазі специфічного запалення, яка домінує при туберкульозі, є одним із чинників гальмування імунної реакції організму на мікобактеріальне вторгнення. Зазначене

обумовлює необхідність подальших досліджень щодо вивчення диференційованого застосування імуномодуляторів під час хіміотерапії хворих на легеневий туберкульоз залежно від фази тканинної запальної реакції.

ЛІТЕРАТУРА

1. Пат. 43658, Україна, МКИ А61В10/00 Спосіб діагностики фази патологічного процесу у хворих на туберкульоз легень: Пат. 43658, Україна, МКИ А61В10/00 /В. П. Шаповалов, О. Л. Кухарчук, В. І. Сливка, В. С. Самараш, М. М. Кузьмін. — № 20011042871; Заявл. 26.04.2001; Опубл. 17.12.2001; Бюл. № 11, — 2001.
2. Хонина Н. А., Леплина О. Ю., Никонов С. Д. Иммунокорригирующий эффект локорегиональной цитокиноterapiи у больных туберкулезом легких // Пробл. туб. — 2000. — № 4. — С. 21–23.
3. Чернушенко Е. Ф. Актуальные проблемы иммунологии во фтизиатрии и пульмонологии // Укр. пульмон. журн. (Матеріали III з'їзду фтизіатрів і пульмонологів України). — 2003. — № 2 (10). — С. 94–96.
4. Barnes, P. F., S. Lu, J. S. Abrams, E. Wang, M. Yamamura, and R. L. Modlin Cytokine production at the site of disease in human tuberculosis // Infect. Immun. — 1993. — Vol. 61, № 8. — P. 3482–3489.
5. Hirsch C. S., Hussain R., Toossi Z. Cross modulation by transforming growth factor in human tuberculosis: Suppression of antigen-driven blastogenesis and interferon production // Immunology. — 1996. — Vol. 93. — P. 3193–3198.
6. Juffermans N. P., Florquin S., L. Camoglio. Interleukin-1 signaling is essential for host defense during murine pulmonary tuberculosis // J. Infect. Dis. — 2000. — Vol. № 18. — № 3 — P. 902–908.
7. Keane, J., S. Gershon, R. P. Wise E. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent // N. Engl. J. Med. — 2001. — № 15. — P. 1098–1104.
8. Law, K., M. Weiden, T. Harkin. Increased release of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha by bronchoalveolar cells lavaged from involved sites in pulmonary tuberculosis // Am. J. Respir. Crit. Care Med. — 1996. — № 2. — P. 799–804.
9. Sieling, P. A., Ochoa M. T., Jullien D. Evidence for human CD4+ T-cells in the CD1-restricted repertoire: derivation of mycobacteriareactive T-cells from leprosy lesions // J. Immunol. — 2000. — № 9. — P. 4790–4796.
10. van Crevel. Innate Immunity to *Micobacterium tuberculosis* // Clinical Microbiology Reviews. — 2002. — Vol. 15, № 2. — P. 294–309.

РОЛЬ ЦИТОКІНІВ У ЛОКАЛЬНІЙ РЕГУЛЯЦІЇ СПЕЦИФІЧНОГО ЗАПАЛЕННЯ У ХВОРИХ НА ДЕСТРУКТИВНИЙ ТУБЕРКУЛЬОЗ ЛЕГЕНЬ

В. П. Шаповалов

Резюме

На підставі результатів імуноферментного аналізу експірату у хворих на вперше діагностований деструктивний туберкульоз легень встановлена суттєва різниця вмісту в експіраті про- та протизапальних цитокінів залежно від фази туберкульозного запалення. Зазначено, що серед вірогідних міжгрупових відмінностей на фоні гіперпродукції інтерферону- γ (більше ніж у два рази) в ексудативній фазі специфічного запалення синтезуються в основному IL-1 β і TNF- α , тоді як у продуктивній фазі — TGF- β_1 . Встановлені зміни свідчать про суттєву різницю цитокінової регуляції локальної імунної відповіді у різні фази специфічного запального процесу легеневого туберкульозу, що необхідно враховувати при призначенні імуномодуючих засобів.

THE ROLE OF THE CYTOKINES IN REGULATION OF SPECIFIC INFLAMMATION IN PATIENTS WITH DESTRUCTIVE LUNG TUBERCULOSIS

V. P. Shapovalov

Summary

The substantial difference of the content of pro- and anti-inflammatory cytokines, estimated by immune-enzyme analysis in expired air cryocondensate, depending on the phase of the inflammation, has been established in patients with destructive pulmonary tuberculosis. On the background of interferon- γ hyperproduction (more than two times higher than normal) in exudative phase of the specific inflammation the IL-1 β and TNF- α cytokines dominated, whereas in productive phase — transforming growth factor- β_1 prevailed. The changes revealed were indicative of the essential differences of cytokine regulation of local immunity response in different phases of specific inflammation process in pulmonary tuberculosis. This should be taken into consideration administering immunocorrective therapy.