

В.П. Шаповалов

Буковинський державний медичний
університет, м Чернівці

ВПЛИВ ПРЕПАРАТУ "ПРОТЕФЛАЗИД"(ГРУПА РУТИНУ) НА КОНЦЕНТРАЦІЮ ЦИТОКІНІВ У КРІОКОНДЕНСОВАНОМУ ЕКСПІРАТІ ВПЕРШЕ ДІАГНОСТОВАНИХ ХВОРИХ НА ДЕСТРУКТИВНИЙ ТУБЕРКУЛЬОЗ ЛЕГЕНЬ В ЕКСУДАТИВНІЙ ФАЗІ СПЕЦИФІЧНОГО ЗАПАЛЕННЯ

Ключові слова: туберкульоз, легені,
цитокіни, лікування, "Протефлазид".

Резюме. За результатами імуноферментного аналізу кріоконденсованого експірату хворих на вперше діагностований деструктивний туберкульоз легень в ексудативній фазі специфічного запалення досліджено вплив препарату "Протефлазид" на локальний профіль про- та антизапальних цитокінів в інтенсивній фазі хіміотерапії. Встановлено, що в ексудативній фазі запалення в експіраті суттєво зростає рівень прозапальних цитокінів IL-1 β і TNF- α , тоді як вміст IFN- γ і TGF- β , вірогідно не змінюється. Використання препарату "Протефлазид" під час інтенсивної хіміотерапії значно підвищує в експіраті вміст IFN- γ та TGF- β , проте не змінює концентрації IL-1 β і TNF- α . Стандартне етіопатогенетичне лікування в період поліхіміотерапії практично не впливає на локорегіональний профіль цитокінів.

Вступ

Вторинний імунодефіцитний стан, який зустрічається у хворих на деструктивний туберкульоз легень, перебігає за двома типами [3]. Для першого типу характерним є зменшення відносної кількості субпопуляцій Т - лімфоцитів, тоді як при другому - виникає абсолютна Т-клітинна лімфоцитопенія за пригнічення проліферативної відповіді Т-лімфоцитів на мітогени, внаслідок зниження секреції інтерлейкіну- 2 (IL-2). На ранніх етапах туберкульозу переважає перший тип імунодефіцитного стану [2,5] При цьому, суттєвим є пригнічення генерації імунокомпетентними клітинами гамма-інтерферону (IFN- γ), який відіграє важливу роль у регуляції клітинної ланки імунітету [10]. Пошуки лікарських засобів, здатних стимулювати секрецію IFN- γ з одночасною нормалізацією вмісту інгібіторних цитокінів "другої хвилі" та прозапальних цитокінів "першої хвилі" є актуальними.

Мета дослідження

З'ясувати вплив препарату "Протефлазид" на локальну секрецію інтерлейкіну -1 бета (IL-1 β), фактора некрозу пухлин - альфа (TNF- α), гама - інтерферону (IFN- γ), трансформувального фактора росту - бета₁ (TGF- β ₁) в ексудативній фазі

туберкульозного запалення вперше виявлених хворих на деструктивний туберкульоз легень у процесі інтенсивної фази хіміотерапії.

Матеріали і методи

Обстежено до і після двох місяців інтенсивної фази лікування (2,29 \pm 0,14 міс) 20 вперше діагностованих хворих на деструктивний туберкульоз легень із бактеріовиділенням верифікованими за клінічним і параклінічними ознаками ексудативно-некротичним типом специфічної запальної реакції. У всіх пацієнтів спостерігався інтоксикаційний синдром (від слабкого до помірно вираженого). Інфільтративний туберкульоз легень діагностовано у більшості хворих - у 67 %, дисемінований - у 33 % випадків. Вік пацієнтів коливався від 17 до 53 років, серед них чоловіки становили 58%. Мікобактерії туберкульозу (МБТ) були, як правило, чутливі до всіх антимікобактеріальних препаратів (АМБП) і лише в 3 випадках виявилися стійкими до 1-2 АМБП (стрептоміцину, ізоніазиду або рифампіцину). Супутні захворювання й ускладнення туберкульозу легень спостерігалися в 4 обстежених хворих. Хворим призначалися щоденно чотири - п'ять антимікобактеріальних препаратів (АМБП) ізоніазид, рифампіцин, піразинамід, стрептоміцин, або етамбутол, до яких зберігалася

чутливість мікобактерій туберкульозу (МБТ). Термін госпіталізації хворих до початку обстеження не перевищував двох днів.

В основну групу увійшли 10 пацієнтів, яким в інтенсивній фазі хіміотерапії призначався флоголітик - "Протефлазид" (препарат із групи рутину). Схема призначення: у перший тиждень щодня (у краплях на грудочку цукру або на хліб) 5 крапель 3 рази на день, другий та третій тиждень - 10 крапель 3 рази на день, четвертий тиждень - 8 крапель 3 рази на день. Групу порівняння склали 10 хворих, які отримували стандартну етіопатогенетичну терапію. Контроль здійснювали 10 практично здорових волонтерів.

Накопичення кріоконденсованого експірату (ККЕ) визначалося на апараті власної конструкції за методикою Г.І. Сидоренка [1981], стандартизованого за розмірами, температурним режимом, часовими параметрами, волюмометрією. Дослідження вмісту цитокінів в експіраті проводили на імуноферментному аналізаторі "Униплан-М" (Росія) за допомогою наборів реагентів для імуноферментного аналізу "ProCon IL-1 β " для визначення ІЛ-1 β (Росія) та "ProCon TNF- α " (ООО "Протеиновый контур", Росія) для визначення ФНП- α . Концентрація у конденсаті видихуваного повітря інтерферону- γ досліджували за допомогою набору реактивів "IFN- γ ELISA KIT"

фірми "DIACLONE Res." (США), трансформувального фактора росту β_1 - "TGF- β_1 ELISA" фірми "DRG Instruments GmbH" (Німеччина). Результати досліджень опрацьовували методами варіаційного статистичного аналізу з визначенням критерію Стьюдента за програмою "BioStat" на PC PENTIUM -У.

Обговорення результатів дослідження

Встановлено що в ексудативній фазі туберкульозного запалення у пацієнтів основної групи у ККЕ підвищення вмісту ІЛ-1 β становило 190 %, TNF- α - 230 %, IFN- γ - 140 %, тоді як рівень TGF- β_1 відповідав контролю (табл.). У хворих групи порівняння до початку стаціонарного лікування в експіраті рівень прозапальних цитокінів ІЛ-1 β і TNF- α перевищував контроль в 2,5 і 2,7 рази відповідно, тоді як концентрації IFN- γ і TGF- β_1 вірогідно від контролю не відрізнялися. Зазначене свідчить про репрезентативність обох груп порівняння

При застосуванні в інтенсивній фазі хіміотерапії протефлазиду в експіраті додаткового збільшення на 95,4 % зазнавала концентрація IFN- γ , внаслідок чого його рівень був майже у 5 разів більшим, ніж в осіб групи порівняння. Окрім того, на 85,4 % у ККЕ зростала концентрація TGF- β_1 , внаслідок чого вміст останнього вдвічі перевищував конт-

Таблиця

Вплив препарату "Протефлазид" на концентрацію цитокінів в експіраті хворих на деструктивний туберкульоз легень в ексудативній фазі специфічного запалення в процесі інтенсивної фази хіміотерапії ($\bar{x} \pm Sx$)

Показники	Контроль (здорові) n=10	Хворі групи порівняння		Основна група хворих	
		до лікування n=10	після лікування n=10	до лікування n=10	після лікування n=10
ІЛ-1 β , пг/мл	33,9 \pm 3,5	85,1 \pm 13,2, p<0,001	97,4 \pm 10,2 p<0,001	109,4 \pm 11,8 p<0,001	91,8 \pm 8,9, p<0,001
TNF α , пг/мл	33,4 \pm 4,6	89,4 \pm 11,8, p<0,001	102,9 \pm 9,9, p<0,001	110,8 \pm 7,5 p<0,001	97,8 \pm 6,9, p<0,001
IFN- γ , пг/мл	28,3 \pm 3,6	48,3 \pm 9,6 p>0,06	57,9 \pm 11,9, p<0,05	67,4 \pm 10,0, p<0,01	131,7 \pm 11,6 p<0,001, p ₁ <0,001, p ₂ <0,001
TGF- β_1 , пг/мл	19,2 \pm 3,2	25,4 \pm 5,3	31,7 \pm 5,4, p>0,06	17,5 \pm 2,8	35,6 \pm 6,0, p<0,05, p ₁ <0,02

Примітки: p - ступінь вірогідності різниці показників порівняно до контролю; p₁ - ступінь вірогідності різниці показників до та після лікування всередині кожної групи; p₂ - ступінь вірогідності різниці показників до або після лікування у пацієнтів групи порівняння і основної групи; n - число спостережень.

роль. У разі традиційного етіопатогенетичного лікування у ККЕ концентрації IL-1 β і TNF- α вірогідних змін не зазнавали і залишалися значно вищими за контроль (в 2,9 і 3,1 раза відповідно). Зростала концентрація IFN- γ (вдвічі перевищувала таку у практично здорових осіб, $p > 0,0\%$), тоді як збільшення вмісту в експіраті TGF- β , на 24,8 % було невірогідним.

Серед міжгрупових змін встановлених після лікування, варто зазначити переважання у хворих основної групи в ККЕ вмісту IFN- γ , рівень якого був в 2,3 раза більшим, ніж у пацієнтів, що отримували стандартний комплекс етіопатогенетичної терапії. Водночас рівень прозапальних цитокінів в експіраті залишався підвищеним (концентрації IL-1 β і TNF- α перевищували контроль у 2,7 і 2,9 раза відповідно).

Раніше нами встановлено, що в ексудативній фазі туберкульозного запалення в експіраті значно зростає вміст дієнових кон'югатів і малонового альдегіду [1], що є непрямим свідченням підвищення функціональної активності альвеолярних макрофагів (МФ) та високої інтенсивності специфічного запального процесу. Одним із найпотужніших регуляторів останнього є цитокіни, які беруть безпосередню участь в універсальному імунологічному механізмі інактивації та елімінації внутрішньоклітинних МБТ [4].

На першому етапі клітинної імунної відповіді патогенний чинник захоплюється МФ, де здійснюється пресинг і презентація його антигенів у складі головного комплексу гістосумісності (МНС) 2 класу CD4+ Т-клітинам. Цей процес супроводжується виділенням макрофагами IL-12, що активує NK-клітини і стимулює їх до генерації IFN- γ . Антиген у складі МНС 2 класу, разом із IL-12 та IFN- γ спонукає CD4+ Т-лімфоцити до перетворення у Th1 клітини. Останні виділяють IL-2, який, у свою чергу, стимулює проліферацію CD8+ цитотоксичних лімфоцитів, а також IFN- γ , що активує МФ. Водночас макрофаги, CD4+ і CD8+-клітини продукують TNF- α і IL-1 β , які активують фактори неспецифічної резистентності організму, а TNF- α знищує шляхом апоптозу хронічно-інфіковані макрофаги, які не здатні до перетравлення захоплених МБТ. Т-лімфоцити (CD8+) також викликають загибель інфікованих МФ шляхом ініціювання апоптозу. Паралельно IFN- γ активує інтактні МФ, що дозволяє останнім ефективно завершувати фагоцитоз МБТ, а поступово при цьому підвищує синтезу TGF- β , активує фіброзогенез, тобто ініціює проліферативну стадію запального процесу [5,9]. МБТ стимулюють, макрофаги і дендритні клітини, що підсилює продукцію прозапального TNF- α , який бере

участь у формуванні гранульом і сприяє тим самим локалізації збудника, оскільки у хворих на туберкульоз генерація TNF- α збільшується саме у зоні його локалізації [6]. Це експериментально підтверджено застосуванням моноклональних антигін проти TNF- α , що призводить до реактивації туберкульозу і виникнення міліарних і позалегенових форм туберкульозу [7].

На відміну від TNF- α , рівень IL-1 β при туберкульозі зростає як системно [4], так і в зоні локалізації збудника [8].

Проте дефіцит IL-1 β також сприяє розповсюдженню МБТ внаслідок дефектів утворення гранульом. Зокрема, серед хворих на туберкульоз із надмірною продукцією антагоніста рецепторів IL-1 β значно частіше зустрічається туберкульозний плеврит [6].

Захисна роль IFN- γ в активації Т-клітинного імунітету при туберкульозі добре відома [6,7], а продукція IFN- γ *in vitro*, яка специфічно індуквана антигеном МБТ, вважається сурогатним маркером туберкульозної інфекції [10]. Лімфоцити підсилюють синтез IFN- γ після контакту з моноцитами, стимульованими мікобактеріями туберкульозу, тоді як NK-клітини здатні збільшувати продукцію IFN- γ у відповідь на пряму стимуляцію мікобактеріальними олігодезоксинуклеотидами [8].

Альвеолярні МФ також підвищують утворення продукцію IFN- γ . Окрім того, IFN- γ продукують Т-клітини, які експресують $\gamma\delta$ -рецептори і здатні самостійно розпізнавати невеликі мікобактеріальні протеїни та небілкові ліганди навіть за відсутності антигенпрезентуючих клітин [10]. Первинний контакт із мікобактеріями суттєво збільшує у регіональних лімфовузлах кількість $\gamma\delta$ -Т-клітин [10], які, окрім того, накопичуються в зоні специфічного запалення, що сприяє ранній локалізації МБТ. Лімфоцити з фенотипом CD3 - CD1+ реагують із ліпідними антигенами МБТ у присутності антигенпрезентуючих клітин, а CD8+ клітини проявляють цитотоксичну активність і є необхідними для лімфоцитарної продукції IFN- γ [10].

Таким чином, встановлена здатність препарату "Протекфлазид" на локальному рівні значно підвищувати концентрацію IFN- γ , що визначає високий протитуберкульозний потенціал клітинної імунної реакції, а інтенсифікація продукції TGF- β , буде реципрокно стримувати надмірний синтез цитокінів "першої хвилі".

Висновки

1. Встановлена здатність препарату "Протекфлазид" в інтенсивній фазі хіміотерапії хворих на вперше діагностований деструктивний легеневий туберкульоз поряд із інтенсифікацією локальної

продукції TGF- β_1 , значно підвищувати концентрацію IFN- γ , що забезпечує високий протитуберкульозний потенціал клітинної імунної відповіді.

2. Застосування стандартного етіопатогенетичного лікування в період інтенсивної хіміотерапії практично не впливає на локорегіональний профіль цитокінів.

Перспектива подальших розробок

Встановлений вплив флоголітику - препарату "Протефлазид" в інтенсивній фазі хіміотерапії вперше виявлених хворих на деструктивний туберкульоз легень в ексудативній фазі специфічного запалення на локальний профіль цитокінів IFN- γ , TGF- β_1 , можна використати для стандартизації і уніфікації засобів патогенетичного лікування туберкульозу, що надає перспективу подальших розробок у даному напрямку.

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 (Україна). - № 20011042871. Заявл.26.04.01; Опубл.17.12.01.-Бюл. №11.-2001. 2. Хонина Н.А., Леплина О.Ю., Никонов С.Д. и др. Иммунокорригирующий эффект локорегиональной цитокинотерапии у больных туберкулезом легких // Пробл. туберк. - 2000. - № 4. - С. 21-23. 3. Чернушенко Е.Ф. Актуальные проблемы иммунологии во фтизиатрии и пульмонологии// Укр. пульмонол. ж. (Матеріали III з'їзду фтизіатрів і пульмонологів України), - 2003.- №2 (10).-С. 94-96. 4. Barnes P.F., Lu S., Abram J.S. et al. 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. et al. Cross modulation by transforming growth factor b in human tuberculosis: Suppression of antigen-driven blastogenesis and interferon g production. // Immunology. - 1996. - V.93. - P. 3193-3198. 6. Juffermans N.P., Florquin S, Camoglio L et al. Interleukin-1 signaling is essential for host defence during murine pulmonary tuberculosis//J. Infect. Dis.- 2000.-Vol. №18.- №3.- P. 902-08. 248. 7. Keane J., Gershon S., Wise R.P. et al. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent// N. Engl. J. Med. 2001.-№15.- P. 1098-1104. 8. Sieling, P. A., M. T. Ochoa, D. Jullien, et al. Evidence for human CD4+ T cells in the CD1-restricted repertoire: derivation of mycobacteria-reactive T cells from leprosy lesions // J. Immunol. -2000.-№9.-P. 4090-40796. 9. Toossi Z., Young T.G., Averill L.E. et al. Induction of transforming growth factor b1 by purified protein derivative of Mycobacterium tuberculosis // Infect. Immun. - 1995. - v. 63. - P. 224 - 228. 10. van Crevel R., Ottenhoff T.H.M. van der Meer J. W. M. Innate Immunity to Mycobacterium tuberculosis // Clinical Microbiology Reviews. - 2002.- Vol.15, № 2. -P. 294-309.

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА "ПРОТЕФЛАЗИД" (ГРУПА РУТИНА) НА СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В КРИОКОНДЕНСИРОВАННОМ ЭКСПИРАТЕ ВПЕРВЫЕ ДИАГНОСТИРОВАННЫХ БОЛЬНЫХ ДЕСТРУКТИВНЫМ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ В ЭКССУДАТИВНОЙ ФАЗЕ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ

В.П. Шаповалов

Резюме. С помощью иммуноферментного анализа криоконденсированного экспирата больных впервые диагностированным деструктивным туберкулезом легких изучено влияние препарата "Протефлазид" на локальный уровень про- и противовоспалительных цитокинов в период интенсивной фазы химиотерапии. Установлено, что в эксудативной фазе специфического воспаления в экспирате существенно возрастает уровень провоспалительных цитокинов IL-1 β и TNF- α , тогда как содержание IFN- γ и TGF- β_1 существенно не изменяется. Использование препарата "Протефлазид" во время полихимиотерапии значительно повышает локальный уровень IFN- γ и TGF- β_1 , однако не влияет на содержание IL-1 β , TNF- α в экспирате. Интенсивная фаза традиционного этиопатогенетического лечения достоверно не изменяет локорегиональный профиль цитокинов.

Ключевые слова: туберкулез, легкие, цитокины, лечение, "Протефлазид".

THE INFLUENCE OF "PROTEPHLAZID (RUTENE GROUP) ON THE CYTOKINE CONCENTRATION IN THE CRYOCONDENSATE EXPIRED AIR OF THE PRIMARILY DIAGNOSED PATIENTS WITH DESTRUCTIVE PULMONARY TUBERCULOSIS IN THE EXUDATIVE PHASE OF SPECIFIC INFILTRATION

V.P. Shapovalov

Abstract. The influence of "Protephlazid" medication on the local level of pro-and antiinflammatory cytokines during the period an intensive chemotherapy phase has been studied by means immune-enzyme analysis of cryocondensate expired air of primarily diagnosed patients with destructive pulmonary tuberculosis. It has been established that the level antiinflammatory IL-1 β and TNF- α cytokines substantially increases whereas IFN- γ and TGF- β_1 content does not essentially change during exudative phase of inflammation.

The appliance of "Protephlazid" medication during polychemotherapy significantly increases IFN- γ and TGF- β_1 local level, although it does not influence upon IL-1 β , TNF- α content in expirate.

The intensive phase traditional of ethiopathogenic treatment for certain does not change cytokine locoregional profile.

Key words: tuberculosis, lungs, treatment, cytokines, "Protephlazid"

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Clin. and experim. pathol. - 2006. - Vol.5, №1.-P.92-95.

Надійшла до редакції 18.03.2006