

В.П.Шаповалов

Вплив препарату «Протефлазид» на концентрацію цитокінів у кріоконденсованому експіраті вперше виявлених хворих на деструктивний туберкульоз легенів в ексудативній фазі специфічного запалення

Буковинська державна медична академія

Вторинний імунodefіцитний стан, що зустрічається майже у всіх хворих на деструктивний туберкульоз легенів, перебігає за двома типами [3]. Для першого характерним є зменшення відносної кількості Т-лімфоцитів або їх субпопуляцій, тоді як другий характеризується розвитком абсолютної Т-клітинної лімфоцитопенії на тлі пригнічення проліферативної відповіді Т-лімфоцитів на мітогени, внаслідок зниження секреції інтерлейкіну-2 (ІЛ-2). На ранніх етапах туберкульозу легенів переважає перший тип імунodefіцитного стану [2, 5] При цьому серед особливостей цитокінового профілю важливим є пригнічення генерації імунoкомпетентними клітинами гамма-інтерферону (IFN- γ), що відіграє надзвичайно важливу роль у регуляції клітинної ланки імунітету [10]. Пошуки лікарських засобів, здатних стимулювати секрецію IFN- γ з одночасним зменшенням надлишкової продукції прозапальних цитокінів «першої хвилі» та нормалізацією вмісту інгібіторних цитокінів «другої хвилі», залишаються актуальними.

Мета роботи – вивчення впливу препарату «Протефлазид» на локальні зміни секреції інтерлейкіну-1бета (ІЛ-1 β), фактора некрозу пухлин-альфа (TNF- α), гамма-інтерферону (IFN- γ) і трансформувального фактора росту-бета₁ (TGF- β_1) в ексудативну патоморфологічну фазу туберкульозного запалення, шляхом встановлення їх концентрацій у кріоконденсаті видихуваного повітря вперше виявлених хворих на деструктивний туберкульоз легенів на тлі комплексної терапії.

Матеріали та методи. У динаміці до і після 2 міс в інтенсивній фазі лікування

вперше виявлених хворих на туберкульоз з торпідним перебігом легеневого процесу в фазі розпаду з верифікованим за клінічними і параклінічними ознаками ексудативно-некротичним типом специфічної запальної реакції. Хворим призначали 4–5 антимикобактеріальних препаратів (АМП), до яких зберігалася чутливість мікобактерій туберкульозу (МБТ). Щодня – стрептоміцин, ізоніазид, рифампіцин; у переривчастому режимі – піразинамід та/чи етамбутол. До основної групи увійшло 10 пацієнтів, яким в інтенсивній фазі поліхіміотерапії призначали ад'ювантний флоголітик протефлазид. Схема призначення: щодня (в краплях на грудочку цукру або на хліб) у перший тиждень – 5 крапель 3 рази на день, другий-третій тиждень – 10 крапель 3 рази на день, четвертий тиждень – 8 крапель 3 рази на день. Групу порівняння становили 10 хворих, які отримували стандартну комплексну етіопатогенетичну терапію. Інфільтративний туберкульоз легенів діагностовано у більшості хворих – у 67% випадків. Вік пацієнтів коливався від 17 до 53 років. Серед них чоловіки становили 58%. У всіх хворих процес супроводжувався бактеріовиділенням. МБТ були, за правило, чутливими до всіх АМП і лише у 3 випадках виявилися стійкими до 1–2 АМП (стрептоміцину, ізоніазиду або рифампіцину). Супутні захворювання й ускладнення туберкульозу легенів спостерігалися у 4 обстежених хворих. У всіх пацієнтів спостерігався інтоксикаційний синдром (від слабого до помірно вираженого). Термін госпіталізації хворих до початку обстеження не перевищував двох днів. Контроль становили 10 практично здорових волонтерів.

Накопичення конденсату видихуваного повітря визначали за методикою Г.І.Сидоренка (1981) на апараті власної конструкції, стандартизованому за розмірами, температурним режимом, часовими параметрами, волюмометрією.

Дослідження вмісту цитокінів у конденсаті видихуваного повітря проводили на імуноферментному аналізаторі «Униплан-М» (Росія) за допомогою наборів реагентів для імуноферментного аналізу «PgoCon IL-1 β » для визначення IL-1 β (Росія) та «PgoCon TNF- α » (ООО «Протеиновый контур», Росія) для визначення ФНП- α . Концентрацію у конденсаті видихуваного повітря інтерферону- γ досліджували за допомогою набору реактивів «IFN- γ ELISA KIT» («DIACLONE Res.», США), трансформувального фактора росту β_1 – «TGF- β_1 ELISA» («DRG Instruments GmbH», Німеччина). Результати досліджень опрацьовували методами варіаційного статистичного аналізу з визначенням критерію Ст'юдента за програмою «BioStat» на PC PENTIUM II.

Результати та обговорення. За результатами дослідження (таблиця) в ексудативну фазу туберкульозного запалення у хворих групи порівняння до початку стаціонарного лікування рівень у КВП прозапальних цитокінів IL-1 β і TNF- α перевищував контроль відповідно в 2,5 і 2,7 раза, тоді як у конденсаті концентрації IFN- γ і TGF- β_1 достовірно від контролю не відрізнялися, хоча рівень IFN- γ зростав майже на 70,7%. У пацієнтів основної групи перед початком лікування підвищення вмісту в конденсаті видихуваного повітря IL-1 β становило 190%, TNF- α – 230%, IFN- γ – 140%, тоді як рівень TGF- β_1 відповідав контролю. Отже, до початку лікування вірогідних змін між зазначеними показниками у хворих обох груп не виявлялося, що свідчить про їх репрезентативність.

Після стандартного етіопатогенетичного лікування, концентрації у КВП IL-1 β і TNF- α вірогідних змін не зазнали і залишалися значно вищими за контроль – у 2,9 і 3,1 раза, відповідно. Концентрація IFN- γ дещо зростала і вдвічі перевищувала таку саму у практично здорових осіб, тоді як збільшення вмісту у конденсаті TGF- β_1 на 24,8% було невірогідним.

Після застосування у комплексному лікуванні протезфлазиду додаткового збільшення на 95,4% зазнавала концентрація у конденсаті IFN- γ , внаслідок чого його рівень був майже у 5 разів більшим, ніж в осіб групи порівняння. Окрім того, на 85,4% зростала концентрація в конденсаті TGF- β_1 , внаслідок чого вміст останнього вдвічі перевищував контроль.

Серед міжгрупових змін, що були встановлені після лікування, варто зазначити значне переважання у КВП хворих основної групи вмісту IFN- γ , рівень якого був в 2,3 раза більшим, ніж у пацієнтів, які отримували стандартний комплекс етіопатогенетичної терапії. Водночас, рівень прозапальних цитокінів у конденсаті видихуваного повітря залишався підвищеним – концентрації IL-1 β і TNF- α перевищували контроль відповідно у 2,7 і 2,9 раза.

Раніше нами було встановлено, що в ексудативно-некротичну фазу туберкульозного запалення у конденсаті видихуваного повітря значно зростає вміст дієвих кон'югатів і малонового діальдегіду [1], що є непрямим свідченням підвищення функціональної активності альвеолярних макрофагів (МФ) та високої інтенсивності специфічного запального процесу.

Одним з найпотужніших регуляторів останнього є цитокіни, що 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 НК-клітини і стимулює їх до генерації IFN- γ . Антиген у складі МНС 2 класу, разом з IL-12 та IFN- γ спонукає CD4+ Т-лімфоцити до перетворення у Th1 клітини. Останні виділяють IL-2, який, в 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 через

апоптоз хронічно-інфіковані макрофаги, що не здатні до ефективного перетравлення захоплених мікобактерій. Т-лімфоцити (CD8+) також викликають загибель інфікованих макрофагів, шляхом ініціювання апоптозу. Водночас IFN- γ активує інтактні МФ, що дозволяє останнім ефективно завершувати фагоцитоз МБТ, а поступове підвищення синтезу TGF- β_1 обмежує інтенсивність запалення і активує фіброзогенез, тобто ініціює проліферативну стадію запального процесу [5, 9]. Мікобактерії туберкульозу стимулюють моноцити, макрофаги і дендритні клітини, що посилює продукцію прозапального TNF- α , який бере участь у формуванні гранульом і сприяє тим самим локалізації туберкульозного збудника, оскільки у хворих на туберкульоз генерація TNF- α збільшується саме в зоні його локалізації [6]. Це експериментально підтверджено застосуванням моноклональних антитіл проти TNF- α , що призводить до реактивації туберкульозу і виникнення міліарних і позапульмональних форм туберкульозу [7]. На відміну від TNF- α , рівень IL-1 β при туберкульозі

зростає як системно [4], так і в зоні локалізації МБТ [8]. Проте, дефіцит IL-1 β також сприяє розповсюдженню збудника туберкульозу, внаслідок дефектів утворення гранульом. Зокрема, серед хворих на туберкульоз з 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 індукована антигеном МБТ, навіть є 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 продукції IFN- γ при туберкульозі легенів. Окрім того, IFN- γ продукують Т-клітини, які експресують $\gamma\delta$ -рецептори і здатні самостійно розпізнавати невеликі мікобактеріаль-

Таблиця

Вплив препарату «Протефлазид» на концентрації цитокінів у конденсаті видихуваного повітря у хворих на деструктивний туберкульоз легенів в ексудативно-некротичну фазу специфічного запального процесу в процесі інтенсивної фази стандартної поліхіміотерапії ($x \pm Sx$)

Показники	Контроль	Група порівняння		Основна група хворих	
	практично здорові люди (n=10)	до лікування (n=10)	після лікування (n=10)	до лікування (n=10)	після лікування (n=10)
IL-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* P ₁ >0,4	109,4 \pm 11,8 P<0,001* P ₂ >0,1	91,8 \pm 8,9 P<0,001* P ₁ >0,2 P ₂ >0,6
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* P ₁ >0,4	110,8 \pm 7,5 P<0,001* P ₂ >0,1	97,8 \pm 6,9 P<0,001* P ₁ >0,2 P ₂ >0,6
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* P ₁ >0,5	67,4 \pm 10,0 P<0,01* P ₂ >0,1	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 P>0,3	31,7 \pm 5,4 P>0,06 P ₁ >0,4	17,5 \pm 2,8 P>0,6 P ₂ >0,2	35,6 \pm 6,0 P<0,05* P ₁ <0,02* P ₂ >0,6

Примітки: P – ступінь вірогідності різниці показників порівняно з контролем; 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.

* – вірогідні зміни досліджуваних показників.

ні протеїни та небілкові ліганди навіть за відсутності антигенпрезентуючих клітин [10]. Первинний контакт з мікобактеріями суттєво збільшує у регіонарних лімфовузлах кількість $\gamma\delta$ -Т-клітин [10], які, окрім того, накопичуються в зоні специфічного запалення, що сприяє ранній локалізації збудника туберкульозу. Лімфоцити з фенотипом CD3-CD1+ реагують з ліпідними або гліколіпідними антигенами мікобактерії у присутності антигенпрезентуючих клітин, а CD8+-клітини проявляють цитотоксичну активність і є необхідними для лімфоцитарної продукції IFN- γ [10].

Таким чином, встановлено здатність препарату «Протефлазид» на локальному рівні значно підвищувати концентрацію IFN- γ , що визначає високий протитуберкульозний потенціал клітинної імунної реакції, а інтенсифікація продукції TGF- β_1 ініціює зниження надмірного синтезу цитокінів «першої хвилі» в легенях.

Висновки. 1. В ексудативну фазу специфічного запалення в криоконденсатованому експіраті хворих на тубер-

кульоз легень значно зростає рівень прозапальних IL-1 β і TNF- α , тоді як концентрації IFN- γ і TGF- β_1 істотно не змінюються.

2. В інтенсивній фазі стандартний комплекс етіопатогенетичного лікування суттєво не впливає на вміст прозапальних і антизапальних цитокінів (IL-1 β , TNF- α , TGF- β_1) та IFN- γ у конденсаті видихуваного повітря хворих на деструктивні форми туберкульозу легень.

3. Включення препарату «Протефлазид» до стандартних схем інтенсивної фази контрольованої хіміотерапії хворих на деструктивний туберкульоз легень значно підвищує концентрації IFN- γ і TGF- β_1 у конденсаті видихуваного повітря.

Встановлені вірогідні зміни локального профілю цитокінів (IFN- α , TGF- β_1) під впливом ад'ювантного флюологітика препарату «Протефлазид» можуть бути використаними для стандартизації і уніфікації засобів патогенетичного лікування, що свідчить про перспективність подальших досліджень у цьому напрямі.

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. // Пробл. туб.– 2000.– №4.– С. 21–23.
3. Чернушенко Е.Ф. // Укр. пульмонол. журн. (Матер. III з'їзду фтизіатрів і пульмонологів України).– 2003.– №2 (10).– С. 94–96.
4. Barnes P.F., Lu S., Abram J.S. et al. // Infect. Immun.– 1993.– V.61, №8.– P. 3482–3489.
5. Hirsch C.S., Hussain R., Toossi Z. et al. // Immunol.– 1996.– V.93.– P. 3193–3198.
6. Juffermans N.P., Florquin S., Camoglio L. et al. // J. Infect. Dis.– 2000.– V.18, №3.– P. 902–908.
7. Keane J., Gershon S., Wise R.P. et al. // N. Engl. J. Med.– 2001.– №15.– P. 1098–1104.
8. Sieling P.A., Ochoa M.T., Jullien D. et al. // J. Immunol.– 2000.– №9.– P. 4090–4096.
9. Toossi Z., Young T.G., Averill L.E. et al. // Infect. Immun.– 1995.– V.63.– P. 224–228.
10. van Crevel R., Ottenhoff T.H.M., van der Meer J.W.M. // Clin. Microbiol. Rev.– 2002.– V.15, №2.– P. 294–309.

Шаповалов В.П.

Влияние препарата «Протефлазид» на содержание цитокинов в криоконденсате выдыхаемого воздуха у впервые выявленных больных деструктивным туберкулезом легких при преобладании экссудативной компоненты специфического воспаления

Результаты иммуноферментного анализа криоконденсата выдыхаемого воздуха у больных впервые выявленным деструктивным туберкулезом легких, у которых доминирует экссудативная компонента специфического воспаления выявили существенные различия локального содержания δ -интерферона и трансформирующего фактора роста- β_1 , обусловленные применением препарата «Протефлазид» в интенсивной фазе стандартной полихимиотерапии.

В экссудативную фазу специфического воспаления в конденсате существенно возрастает уровень провоспалительных IL-1 β и TNF- α , тогда как содержание IFN- γ и TGF- β_1 практически не изменяется.

Интенсивная фаза традиционного этиопатогенетического лечения профиль IL-1 β , TNF- α , IFN- γ и TGF- β в криоконденсате выдыхаемого воздуха достоверно не изменяет. В то же время включение препарата «Протефлазид» в стандартные схемы антимикобактериальной терапии существенно повышает локальный уровень IFN- γ и TGF- β_1 .

Shapovalov V.P.

«Protephlazid» influence upon the content of cytokines in the expired air cryocondensate of the first revealed TB patients with pulmonary destructive process in the exudative phase of specific process

The result of immunoassay of the expired air cryocondensate in the first revealed TB patients with pulmonary destructive process with the prevailing of exudative component of inflammation determined essential differences of IFN- γ and TGF- β_1 contents, due to the application of «Protephlazid» in the intensive phase multimodality therapy.

During of exudative phase tuberculosis inflammation the level of pro-inflammatory IL-1 β i TNF- α in the expired air of TB patients with pulmonary destructive process considerably increases, while IFN- γ and TGF- β_1 contents does not change significantly.

Traditional complex anti-TB treatment in the intensive phase multimodality therapy does not influence upon the profile of cytokines IL-1 β , TNF- α , TGF- β_1 and IFN- γ in expirate of TB patients. Where as, the use of «Protephlazid» along with the standart multimodality therapy increases IFN- γ and TGF- β_1 contents in expirate, which initiates processes concerning reduction of pro-inflammatory of cytokine concentration in the lung.