

## ВПЛИВ БІОЛОГІЧНО-АКТИВНОГО КОМПЛЕКСУ “АПІТОНІК” НА ЦИТОКІНОВИЙ ПРОФІЛЬ КРІОКОНДЕНСОВАНОГО ЕКСПІРАТУ У ВПЕРШЕ ВИЯВЛЕНИХ ХВОРИХ НА ДЕСТРУКТИВНИЙ ТУБЕРКУЛЬОЗ ЛЕГЕНЬ ПРИ ПРОДУКТИВНО- НЕКРОТИЧНІЙ ФАЗІ СПЕЦИФІЧНОГО ЗАПАЛЕННЯ

Кафедра шкірно-венеричних хвороб та туберкульозу (зав. – доц. І.О. Денисенко)  
Буковинської державної медичної академії

**Резюме.** За результатами імуноферментного аналізу кріоконденсованого експірату у вперше виявлених хворих на деструктивний туберкульоз легень з переважанням продуктивно-некротичного типу тканинної запальної реакції встановлена істотна зміна профілю в експіраті про- і протизапальних цитокінів та інтерферону-гама під впливом інтенсивної фази стандартної поліхіміотерапії із застосуванням апітоніку. У продуктивну фазу специфічного запалення в конденсаті хворих зменшується рівень прозапального ІЛ-1бета за сталої концентрації TNF-альфа, що супроводжується вірогідним підвищенням концентрації IFN-гама та збільшення вмісту інгібітору запалення – TGF-бета. Визначено, що традиційне етіопатогенетичне лікування хворих на легцевий туберкульоз у продуктивну фазу специфічного запалення нормалізує вміст у КВП прозапальних цитокінів та IFN-гама, але не впливає на рівень у конденсаті TGF-бета. Проте використання апітоніку в комплексному лікуванні нормалізує концентрацію в конденсаті TGF-бета, зменшує рівень ІЛ-1бета і TNF-альфа, що відбувається за значного зростання концентрації IFN-гама.

**Ключові слова:** туберкульоз, легені, цитокіни, лікування, апітонік.

**Вступ.** Клінічний перебіг несвоєчасно діагностованого туберкульозу легень у більшості хворих ускладнюється вторинним імунодефіцитом [3]. Початок туберкульозного запалення характеризується зниженням відносної кількості Т-лімфоцитів або їх субпопуляцій, однак при прогресуванні процесу нестача факторів імуногого запалення набуває ознак другого типу (абсолютна Т-лімфоцитопенія або знижена мітоген-індукована проліферація Т-клітин), що супроводжується зменшенням продукції інтерлейкіну-2 (ІЛ-2) і помірним зниженням синтезу ІЛ-1 і підсиленням генерації фактора некрозу пухлин-альфа (TNF-альфа) [2]. Серед імуносупресорів найпотужніші ефекти виявляє трансформувальний фактор росту-бета (TGF-бета), надмірна генерація якого здатна призвести до пригнічення як локальної, так і системної імунної відповіді [11]. Це свідчить про необхідність спрямованого пошуку засобів корекції цитокінового профілю в ділянці запалення, особливо у хворих із домінуванням проліферативно склеротичних процесів.

**Мета дослідження.** З'ясувати вплив комплексного протитуберкульозного лікування з використанням апітоніку на локальну секрецію інтерлейкіну-1бета (ІЛ-1бета), фактора некрозу пухлин альфа (TNF-альфа), інтерферону-гама (IFN-гама) і трансформувального фактора росту-бета (TGF-бета) в продуктивну фазу туберкульозного запалення шляхом дослідження концентрацій цитокінів у кріоконденсованому експіраті хворих на вперше виявлені деструктивні форми туберкульозу легень з переважанням продуктивно-проліферативно-склеротичних процесів.

**Матеріал і методи.** У динаміці до і після двох місяців в інтенсивній фазі лікування (2,29±0,14 міс.) обстежено 20 вперше виявлених хворих на туберкульоз з торіючим перебігом легеневого процесу у фазі розпаду. Інфільтративний процес діагностовано у 58% дисемінований – у 42% випадків. Хворим призначалися чотири-п'ять антимікобактеріальних препаратів (АМП) до яких зберігалася чутливість мікобактерій туберкульозу (МБТ). Щоденно – стрептоміцин, ізоніазид, рифампіцин; у нереривчастому режимі – піразинамід, етамбутол або один з них. Групу порівняння склали 10 хворих, у яких клінічно і рентгенологічно була верифікована продуктивно-некротична фаза туберкульозного запалення, і призначена стандартна етіопатогенетична терапія. До складу основної групи увійшли 10 пацієнтів з аналогічними проявами тканинної запальної реакції, яким на фоні стандартної поліхіміотерапії додатково призначався апітонік по 2,5 г двічі на добу на фоні аерозольного введення ліпіну (нормалізатора процесів перекисного окиснення легеневого сурфактанта) впродовж усієї фази інтенсивної поліхіміотерапії. Вік пацієнтів коливався від 17 до 59 років. Серед них чоловіки становили 59%. Мікобактерії туберкульозу були, як правило, чутливі до усіх АМП і лише у чотирьох пацієнтів виявилися первинно стійкими до 1-2 АМП (стрепто-

міцину, ізоніазиду або рифампіцину). Супутні захворювання й ускладнення туберкульозу легень спостерігалися в одній третині обстежених. У всіх хворих виявлено іптоксикаційний синдром (від слабкого до помірно вираженого). Термін госпіталізації хворих до початку обстеження не перевищував двох днів. Контрольну групу склали 10 волонтерів – практично здорових осіб.

Накопичення конденсату видихуваного повітря визначали на апараті власної конструкції за методикою Г.І. Сидоренка [1981], стандартизованого за розмірами, температурним режимом, часовими параметрами, волюмометрією.

Дослідження концентрацій цитокінів у конденсаті видихуваного повітря проводили на імуноферментному аналізаторі “Униплан-М” (Росія) за допомогою наборів реагентів для імуноферментного аналізу “ProCon IL-1бета” для визначення ІЛ-1бета (Росія) та “ProCon TNF-альфа” (ООО “Протеиновый контур”, Росія) для визначення ФНП-альфа. Рівень у конденсаті інтерферону-гама досліджували за допомогою набору реактивів “IFN-гама ELISA KIT” фірми “DIACLONE Res.” (США), трансформувального фактора росту бета, “TGF-бета1 ELISA” фірми “DRG Instruments GmbH” (Німеччина). Результати досліджень опрацьовували методами варіаційного статистичного аналізу з визначенням критерію Стьюдента за програмою “BioStat” на PC Pentium II.

**Результати дослідження та їх обговорення.** В продуктивну фазу туберкульозного запалення в легенях у хворих групи порівняння до початку лікування концентрація у конденсаті видихуваного повітря ІЛ-1бета на 33,3% менша за контроль, концентрація TNF-альфа не відрізнялася від контрольних показників, а вміст ІFN-гама і TGF-бета<sub>1</sub> перевищував такий у практично здорових осіб відповідно в 2,4 та 4,9 раза. Подібні зміни профілю цитокінів у КВП спостерігали й у хворих основної групи, в яких до початку лікування рівень ІЛ-1бета був нижчим за контроль на 30,7%, вміст ІFN-гама і TGF-бета<sub>1</sub> перевищував контрольні показники у 2,6 і 4,6 раза, а концентрація TNF-альфа в конденсаті відповідала контролю (див табл.).

Доцільно звернути увагу на те, що вірогідної різниці показників цитокінів у хворих обох груп до початку лікування не спостерігалось.

Таб. пня

**Вплив в інтенсивній фазі стандартних схем поліхіміотерапії з використанням апітовіку на концентрацію цитокінів у кріоконденсованому експіраті у хворих на деструктивний туберкульоз легень (x±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
<b>ІЛ-1β, пг/мл</b>	33,9±3,5	22,6±3,4 p<0,05*	29,8±4,0 p>0,4 p <sub>1</sub> >0,1	23,5±2,8 p<0,05* p <sub>2</sub> >0,8	43,1±5,3 p>0,1 p <sub>1</sub> <0,01* p <sub>2</sub> >0,05
<b>TNFα, пг/мл</b>	33,4±4,6	29,8±4,0 p>0,5	25,8±3,9 p>0,2 p <sub>1</sub> >0,4	30,6±4,2 p>0,6 p <sub>2</sub> >0,8	39,9±6,4 p>0,4 p <sub>1</sub> >0,2 p <sub>2</sub> >0,07
<b>ІFN-γ, пг/мл</b>	28,3±3,6	69,2±10,9 p<0,01*	52,2±12,6 p>0,08 p <sub>1</sub> >0,3	71,3±8,8 p<0,001* p <sub>2</sub> >0,8	148,4±10,7 p<0,001* p <sub>1</sub> <0,001* p <sub>2</sub> <0,001*
<b>TGF-β<sub>1</sub>, пг/мл</b>	19,2±3,2	93,2±13,4 p<0,001*	103,9±15,3 p<0,001* p <sub>1</sub> >0,6	89,1±11,0 p<0,001* p <sub>2</sub> >0,8	16,1±3,2 p>0,5 p <sub>1</sub> <0,001* p <sub>2</sub> <0,001*

**Примітки.** p – ступінь вірогідності різниці показників відносно контролю; p<sub>1</sub> – ступінь вірогідності різниці показників до та після лікування всередині кожної групи; p<sub>2</sub> – ступінь вірогідності різниці показників до або після лікування у пацієнтів контрольної і основної груп; n – число спостережень.

\*- вірогідні зміни досліджуваних показників.

У пацієнтів групи порівняння після лікування вірогідних змін концентрацій цитокінів в експіраті не виявлялося, рівні ІЛ-1бета та ІFN-гама відповідали контролю, концентрація TGF-бета<sub>1</sub> залишалася в 5,4 раза вищою за таку в практично здорових осіб.

У хворих основної групи, у комплексному лікуванні яких використовували апітонік, наприкінці спостереження концентрація ІЛ-1бета у конденсаті зростала на 83,4% і відповідала контролю. Рівень TNF-альфа не змінювався, а концентрація ІFN-гама збільшувалася в 2,1 раза, перевищуючи такий у практично здорових осіб групи контролю в 5,2 раза. Водночас рівень у конденсаті TGF-бета<sub>1</sub> залишався сталим і був майже в 6 разів меншим за контроль.

Результати порівняльного аналізу свідчать, що після диференційованого патогенетичного лікування в осіб групи порівняння й основної групи рівень у конденсаті ІЛ-1бета та TNF-альфа не відрізнявся, тоді як концентрація ІFN-гама була у 2,8 раза більшою, а концентрація TGF-бета<sub>1</sub>, навпаки, у 6,5 раза меншою у разі використання в комплексному лікуванні апітоніку.

Інтерпретацію отриманих результатів варто проводити на підставі сучасних уявлень щодо ролі цитокінів у регуляції імунологічної реактивності організму. Відомо, що на першому етапі клітинної імунної відповіді МБТ захоплюється макрофагами (МФ), які презентують антигени туберкульозного збудника Т-хелперам, активують природні кілери і стимулюють утворення ІFN-гама. У свою чергу, CD4<sup>+</sup> Т-лімфоцити виділяють ІЛ-2, який стимулює проліферацію CD8<sup>+</sup> цитотоксичних лімфоцитів, а також ІFN-гама, що активує МФ. Водночас макрофаги, CD4<sup>+</sup> і CD8<sup>+</sup> Т-лімфоцити продукують прозапальні цитокіни ІЛ-1бета і TNF-альфа. Останній за участі CD8<sup>+</sup> Т-лімфоцитів індукуює апоптоз хронічно-інфікованих макрофагів, які не здатні до ефективного перетравлення захоплених мікобактерій, тоді як активація ІFN-гама неінфікованих МФ дозволяє останнім ефективно завершувати фагоцитоз МБТ. Прозапальні цитокіни за принципом біологічного зворотного зв'язку індукують синтез TGF-бета, який є потужним імуносупресором і володіє здатністю обмежувати запалення та викликати фіброз, тобто ініціює третю, проліферативну стадію запалення [1].

Отже, результати нашого дослідження узгоджуються з даними літератури про локальні фазові зміни секреції про- і протизапальних цитокінів при туберкульозному запаленні.

Експериментально доведено, що застосування моноклональних антитіл проти TNF-альфа призводить до реактивації туберкульозу, включаючи міліарні і позапульмональні форми хвороби [9], а дефіцит ІЛ-1бета сприяє розмноженню збудника туберкульозу внаслідок дефектів утворення гранульом [8]. Серед хворих на туберкульоз людей з рефрактерністю до високого рівня ІЛ-1бета, внаслідок надмірної продукції антагоніста рецепторів ІЛ-1бета, частіше трапляється туберкульозний плеврит [12]. Щодо інтерферонів, то захисна роль ІFN-гама при туберкульозі добре відома, особливо за активації антиген-специфічного Т-клітинного імунітету [5].

Хвилеподібний перебіг легеневого туберкульозного запалення з адекватними змінами генерації про- і протизапальних цитокінів може порушуватися внаслідок того, що продукти МБТ індукують синтез TGF-бета моноцитами і дендритними клітинами [11]. Доведено, що специфічний антиген вірулентних мікобактерій спрямовано підсилює утворення TGF-бета. У зоні локалізації збудника при туберкульозі рівень TGF-бета різко зростає разом з підвищенням вмісту ІЛ-10, однак TGF-бета не стимулює, а пригнічує клітинний імунітет: інгібує проліферацію Т-клітин і утворення ними ІFN-гама, зменшує синтез прозапальних цитокінів та знижує презентацію антигенів макрофагами, блокуючи активацію імунокомпетентних клітин [11]. При туберкульозі TGF-бета бере участь в ушкодженні тканин внаслідок надмірного фіброзогенезу, оскільки є промотором продукції і депозиції макрофагальних колагенів і синтезу колагенового матриксу фібробластами [11]. Встановлено, що інгібітори TGF-бета усувають супресивний ефект останнього на мононуклеарні клітини хворих на туберкульоз, а також активують МФ, які інфіковані МБТ [7]. У період протизапальної відповіді TGF-бета значно підсилює продукцію ІЛ-10 і обидва цитокіни виявляють синергізм щодо пригнічення синтезу ІFN-гама [10]. Нещодавно встановлено, що в анергічних хворих на туберкульоз присуття конститутивна продукція ІЛ-10, що викликає дефекти сигнальної трансдукції при стимуляції Т-клітин [12]. Подібний антагоністичний ефект виявляє і TGF-бета1 [11].

Отже, надмірна генерація TGF-бета у зоні специфічного запалення є одним з чинників пригнічення локальної імунної реакції організму на мікобактеріальну інфекцію і тому потребує відповідної корекції. Результати нашого дослідження

свідчать, що одним із засобів щодо зниження інтенсивності утворення синтезу TGF-бета<sub>1</sub> у продуктивну фазу специфічного туберкульозного запалення в легенях, є апітонік.

**Висновки.** 1. У продуктивну фазу специфічного туберкульозного запалення в кріоконденсованому експіраті хворих на туберкульоз легень зменшується рівень прозапального IL-1бета за сталої концентрації TNF-альфа, що супроводжується істотним підвищенням концентрації IFN-гама та різким збільшення вмісту TGF-бета<sub>1</sub> – протизапального інгібіторного цитокіну “другої хвилі”.

2. Стандартна етіопатогенетична терапія хворих на деструктивний легеневий туберкульоз у продуктивну фазу специфічного запалення нормалізує концентрацію в експіраті прозапальних цитокінів та IFN-гама, але не впливає на рівень TGF-бета<sub>1</sub>.

3. Використання апітоніку в комплексному лікуванні хворих на туберкульоз легень у продуктивну фазу специфічного запалення нормалізує рівень у конденсаті не тільки TGF-бета<sub>1</sub>, але й IL-1бета і TNF-альфа, що відбувається на тлі значного зростання концентрації IFN-гама.

**Перспективи подальших розробок.** Нормалізуюча дія біологічно-активного комплексу “Апітонік” на локальну продукцію (в легенях) TGF-бета<sub>1</sub>, що відбувається на фоні значного зростання концентрації IFN-гама у хворих у продуктивну фазу специфічного запалення може бути використаним для стандартизації та уніфікації засобів патогенетичного лікування відповідно до вимог Національної програми боротьби з туберкульозом (2002-2005 рр.).

**Література** 1. Мешкова Р.Я. Руководство по иммунопрофилактике для врачей – СПб.: Медицина, 2002. – 256 с. 2. Хонина Н.А., Леплина О.Ю., Никонов С.Д. и др. Иммунокорригирующий эффект локальной 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. (Матер. III з'їзду фтизіатрів і пульмонологів України). – 2003. – 2 (10). – С.94–96. 4. Andersen P. Host responses and antigens involved in protective immunity to Mycobacterium tuberculosis // Scand. J. Immunol. – 1997. – Vol.45, №2. – P.115-131. 5. Barnes P.F., Lu S., Abrams J.S., et al. Cytokine production at the site of disease in human tuberculosis // Infect. Immun. 1993. – Vol.61, №8. – P.3482–3489. 6. Boussiotis V.A., Tsai E.Y., et al. IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients // J. Clin. Invest. – 2000. – V.105, №9. – P.1317-1325. 7. 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. – Vol.93, №5. – P.3193-3198. 8. Juffermans N.P., Florquin S., Camoglio L., et al. Interleukin-1 signaling is essential for host defense during murine pulmonary tuberculosis // J. Infect. Dis. – 2000. – Vol.8, №3. – P.902-908. 9. 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. – Vol.345, №15. – P.1098–1104. 10. Ohtsuno C., Hirsch C.S., Hamilton B.D., et al. Interaction of Mycobacterium tuberculosis-induced transforming growth factor -b, and interleukin-10 // Infect. Immun. – 1999. – Vol.67, №1. – P.5730-5735. 11. Toossi Z., Young T.G., Averill L.E. et al. Induction of transforming growth factor b, by purified protein derivative of Mycobacterium tuberculosis // Infect. Immun. – 1995. – Vol.63, №2. – P.224–228. 12. Wilkinson R.J., Patel P., Llewelyn M., et al. Influence of polymorphism in the genes for the interleukin (IL)-1 receptor antagonist and IL-1 on tuberculosis // J. Exp. Med. – 1999. – Vol.189, №12. – P.1863–1874.

## THE INFLUENCE OF THE BIOLOGICALLY ACTIVE "APITONIC" COMPLEX ON THE CYTOKINE PROFILE OF EXPIRED CRYOCONDENSATE IN NEWLY TB CASES WITH DESTRUCTIVE PULMONARY PROCESS AT THE PRODUCTIVE-NECROTIC STAGE OF SPECIFIC INFLAMMATION

V.P. Shapovalov

**Abstract.** An essential change of the condensate profile of pro- and anti-inflammatory cytokines and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) under the influence of the intensive stage of standard polychemotherapy, employing apitonic, has been determined according to the findings of immunonassay of the expired cryocondensate (EGA) of newly TB cases with destructive pulmonary process the prevalence of the productive-necrotic type of a tissue specific inflammatory reaction.

The level of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$  lowers with a permanent concentration of TNF- $\alpha$  during the productive phase of specific inflammation in the patients' EGA that is accompanied by a significant increase of the IFN- $\gamma$  concentration and an increase of the content of the powerful inflammation inhibitor – TGF- $\beta_1$ . It has been determined that traditional ethiopathogenetic treatment of patients with pulmonary tuberculosis at the productive phase of specific inflammation normalizes the content of proinflammatory cytokines and IFN- $\gamma$  in the EGA, but does not influence upon the TGF- $\beta_1$  in the condensate. However the use of apitonic in multimodality treatment normalizes the TGF- $\beta_1$  condensate concentration, decreases the level of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  that takes place in case of a considerable IFN- $\gamma$  concentration.

**Key words:** tuberculosis, lung, cytokines, treatment, apitonic.

Bukovinian State Medical Academy (Chernivtsi)  
Buk. Med. Herald. – 2003. – Vol.7, №4. – P.126–129.

Надійшла до редакції 10.11.2003 року