

## ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ БОЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННО-УСТОЙЧИВЫМ И ЛЕКАРСТВЕННО-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫМ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

*М.И. Китаев, А.Ш. Алишеров, Е.В. Дуденко, С.С. Сыдыкова, О.А. Чонорова*

Представлено сравнительное сопоставление синтеза провоспалительных и противовоспалительных цитокинов ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-4, ИЛ-6, ФНО- $\alpha$  у больных лекарственно-устойчивым и лекарственно-чувствительным инфильтративным туберкулезом легких.

*Ключевые слова:* туберкулез легких; лекарственная устойчивость; лекарственная чувствительность; цитокины.

**Актуальность темы.** Цитокины – биологически активные гликопротеиды, с низкой молекулярной массой, синтезируются практически всеми активированными клетками организма. Система цитокинов – это регуляторная сеть медиаторов [1]. С помощью цитокинов осуществляется взаимодействие активированных клеток иммунной системы между собой и с клетками других систем организма [2]. Строго специфические рецепторы к цитокинам имеются на всех клетках организма.

Цитокины действуют по эстафетному принципу, в виде цитокинового каскада. Они выделяются клетками только при внешних воздействиях, обеспечивая гомеостаз и иммунную защиту. Основным видом деятельности цитокинов – регуляция иммунного ответа [3].

Система цитокинов играет важную роль в регуляции воспалительных процессов [4]. Основными цитокинами, участвующими в воспалительном процессе, являются ИЛ-1, ИЛ-4, ИЛ-6,  $\alpha$ -ФНО.

ИЛ-1 $\beta$  продуцируется активированными макрофагами. Высокая концентрация этого цитокина связана с воспалительными процессами при инфицировании организма бактериями, вирусами и паразитарными инвазиями. ИЛ-1 $\beta$  является ключевым индуктором острофазовых реакций.

ИЛ-4 синтезируется Т-хелперами второго типа. Играет важную роль в секреции цитокинов, необходимых для гуморального иммунного ответа. Подавляет синтез провоспалительных цитокинов ФНО- $\alpha$ .

ИЛ-6 продуцируется активированными Т-лимфоцитами и макрофагами. Регулирует им-

мунный ответ и острофазовые реакции, играет ключевую роль в развитии воспаления и иммунного ответа на инфекцию и травму.

ФНО- $\alpha$  (фактор некроза опухолей) синтезируется макрофагами и лимфоцитами, обладает цитотоксическим действием, иммуномодулирующим и провоспалительным эффектом. Индуцирует острофазовые реакции.

Туберкулез относят к цитокинзависимым заболеваниям с количественным дисбалансом субпопуляций Т-лимфоцитов и изменениями в цитокиновой сети. Т-лимфоциты способны синтезировать иммуоцитокнины, с которыми связано развитие клеточных механизмов защиты при инфекционном процессе, индуцированном микобактериями туберкулеза (МБТ) [5]. Гиперактивация МБТ может быть причиной угнетения продукции иммунологически важных цитокинов (иммуоцитокнинов), вырабатывая факторы, тормозящие их действие [6].

Одной из причин неблагоприятного течения туберкулеза является высокая продукция провоспалительных цитокинов. Противовоспалительные цитокины способны подавлять цитотоксическую активность иммунокомпетентных клеток [7].

Участие цитокинов в реализации иммунного ответа при лекарственно-устойчивом туберкулезе легких изучено недостаточно.

Цель исследования – провести сравнительное сопоставление спонтанного синтеза провоспалительных (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ФНО- $\alpha$ ) и противовоспалительных (ИЛ-4) цитокинов у больных лекарственно-устойчивым и у больных лекарственно-чувствительным инфильтративным туберкулезом легких.

Содержание цитокинов в сыворотке крови больных инфильтративным туберкулезом легких ( $M \pm m$ )

Цитокины	Лекарственная чувствительность МБТ, пг/мл, n=20	Лекарственная устойчивость МБТ, пг/мл, n=27	Здоровые лица (норма), пг/мл, n=68
ФНО- $\alpha$	1,33 $\pm$ 0,48	1,11 $\pm$ 0,43	0,50 $\pm$ 0,08
ИЛ-1 $\beta$	0,73 $\pm$ 0,15*	1,07 $\pm$ 0,34	1,60 $\pm$ 0,28
ИЛ-4	0,47 $\pm$ 0,19*	1,08 $\pm$ 0,40	1,50 $\pm$ 0,23
ИЛ-6	20,47 $\pm$ 3,73*	15,72 $\pm$ 3,24*	2,00 $\pm$ 0,26

Примечание: \* – здесь и в табл. 2 – достоверная разница по сравнению с нормой ( $p < 0,05$ ).

### Задачи исследования

1. Изучить содержание цитокинов в сыворотке крови больных лекарственно-чувствительным туберкулезом легких.

2. Изучить содержание цитокинов в сыворотке крови больных лекарственно-устойчивым туберкулезом легких.

3. Изучить цитокиновый баланс у больных туберкулезом легких.

4. Изучить дифференцировочные антигены лимфоцитов у больных лекарственно-устойчивым и лекарственно-чувствительным туберкулезом легких (“укороченная панель”).

**Материалы и методы.** Объектом исследования являлись 47 впервые выявленных больных инфильтративным туберкулезом легких в возрасте от 20 до 60 лет, находящихся на стационарном лечении в Национальном центре фтизиатрии (НЦФ).

В зависимости от чувствительности МБТ к противотуберкулезным химиопрепаратам больные были разделены на две группы. Первую группу составляли больные первичным туберкулезом легких, выделяющие МБТ, чувствительные к изониазиду и рифампицину (20 чел.). Во вторую группу входили больные первичным туберкулезом легких, выделяющие МБТ, устойчивые к этим препаратам (27). Отдельно рассматривались в сравнительном плане больные с первичной (15) и вторичной (12) лекарственной устойчивостью МБТ к изониазиду и рифампицину.

Выявление лекарственной устойчивости МБТ проводилось с помощью биочип-метода (14 больных), с использованием бактериологического метода путем посева МБТ на среду Левенштейна–Йенсена (15) и методом МГИТ (18).

Цитокины ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-4, ИЛ-6 и ФНО- $\alpha$  в сыворотке крови больных туберкулезом легких определялись с помощью иммуноферментного анализа.

Определение дифференцировочных антигенов лимфоцитов проводилось методом непрямой иммунофлуоресценции с помощью моноклональных антител (ООО “Сорбент”, г. Москва). Использовалась “укороченная” панель моноклональных антител для идентификации CD-маркеров: CD3+, CD4+, CD8+, CD20+, CD16+.

**Результаты и обсуждение.** Содержание провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в крови больных инфильтративным туберкулезом легких с лекарственной устойчивостью и лекарственной чувствительностью МБТ к изониазиду и рифампицину представлено в табл. 1.

У больных с лекарственной чувствительностью к противотуберкулезным препаратам возрастало содержание провоспалительного цитокина ФНО- $\alpha$ . Другой провоспалительный цитокин ИЛ-1 $\beta$  и противовоспалительный цитокин ИЛ-4 у этой категории больных были снижены. Высокий уровень цитокина ИЛ-6 отмечался практически у всех исследованных больных (см. табл. 1).

У больных с лекарственной устойчивостью к изониазиду и рифампицину также резко возрастало содержание в крови белка острой фазы воспаления ИЛ-6, который на ранних стадиях развития воспалительной реакции является более чувствительным показателем, чем С-реактивный белок [8]. Согласно литературным данным, повышение продукции ИЛ-6 выявлено при распространенных легочных процессах с выраженными симптомами туберкулезной интоксикации [9].

При сравнительном сопоставлении цитокинового профиля, создается впечатление о снижении уровня ИЛ-6 в крови больных туберкулезом легких с лекарственной устойчивостью относительно содержания этого белка у больных с лекарственной чувствительностью (табл. 1).

В рамках данного исследования нами проводилось изучение содержания цитокинов крови

Таблица 2

Содержание цитокинов в сыворотке крови больных инфильтративным туберкулезом легких с первичной и вторичной лекарственной устойчивостью МБТ (M±m)

Цитокины	Лекарственная устойчивость МБТ пг/мл,		Здоровые лица (норма), пг/мл, n=68
	первичная, n=15	вторичная, n=12	
ФНО-α	2,00±0,68*	0	0,50±0,08
ИЛ-1β	1,27±0,52	0,82±0,11*	1,60±0,28
ИЛ-4	1,58±0,62	0,46±0,49*	1,50±0,23
ИЛ-6	20,27±5,03*	10,20±3,19*	2,00±0,26

Таблица 3

Содержание субпопуляций лимфоцитов в крови больных инфильтративным туберкулезом легких (M±m)

Тест	ЛЧ, n=10	ЛУ, n=19	Первичная ЛУ, n=7	Вторичная ЛУ, n=12	Норма, n=46
CD3+	35,50±1,54	32,47±1,62*	34,71±1,96	31,58±2,31*	40,40±3,20
CD20+	20,10±1,23	19,89±1,12	19,57±1,10	20,08±1,60	22,20±2,10
CD4+	16,00±1,03*	14,68±1,06*	15,57±0,70*	15,00±1,33*	31,30±2,80
CD8+	19,60±0,82*	17,68±1,06*	18,29±0,98*	17,33±1,51*	11,60±1,10
CD16+	16,40±1,85*	20,89±2,42*	22,29±4,89*	20,08±1,77*	5,20±0,30
ИРИ	0,81±0,05*	0,84±0,08*	0,85±0,02*	0,84±0,12*	2,70±1,95

Примечание: \* – достоверная разница по сравнению с нормой (p<0,05).

больных с первичной и вторичной лекарственной устойчивостью МБТ (табл. 2).

При первичной лекарственной устойчивости резко возрастало содержание ИЛ-6 в общей циркуляции. При вторичной лекарственной устойчивости содержание ИЛ-6 также было достоверно выше нормы. Концентрация ИЛ-1β и ИЛ-4 при вторичной лекарственной устойчивости достоверно ниже показателей у здоровых лиц.

Заметно превышение концентрации цитокина ИЛ-6 у больных с первичной лекарственной устойчивостью по сравнению с больными с вторичной лекарственной устойчивостью (p<0,05).

Уровень фактора некроза опухоли в крови у таких больных превышал показатели нормы и соответствующие параметры у больных туберкулезом с вторичной лекарственной устойчивостью и больных с лекарственной чувствительностью МБТ (см. табл. 1, 2).

Пониженный уровень ФНО-α у больных с вторичной лекарственной устойчивостью отражает несостоятельность иммунной защиты организма [10].

Концентрация ИЛ-1β и ИЛ-4 у этих больных также была ниже нормы.

Продолжая эти исследования, мы изучали соотношение провоспалительных и противовоспалительных цитокинов у больных туберкулезом легких – так называемый цитокиновый баланс: (ФНО-α+ИЛ-1β+ИЛ-6)/(ИЛ-4) [11].

Величина этого соотношения у больных лекарственно-чувствительным туберкулезом легких в 17,56 раза превышала аналогичный показатель у практически здоровых лиц (контрольная группа). При лекарственно-устойчивой форме туберкулеза легких этот показатель был примерно в три раза меньше (6,07).

При вторичной лекарственной устойчивости величина соотношения цитокинов была значительно выше, чем при первичной устойчивости (соответственно 8,78 и 5,46).

Все это свидетельствует о смещении баланса в сторону провоспалительных цитокинов при туберкулезе легких.

Проведенные исследования свидетельствуют о значимой роли цитокиноопосредованных механизмов в патогенезе этого заболевания.

Известно, что основными продуцентами цитокинов являются Т-клетки и активированные макрофаги (иммунокомпетентные клетки).

Нами изучались основные параметры клеточного иммунитета у больных инфильтративным туберкулезом легких в сопоставлении с параметрами провоспалительных и противовоспалительных цитокинов.

Наши исследования в этом направлении позволили выделить следующие варианты иммунных сдвигов (табл. 3).

1. Снижение в общей циркуляции содержания Т-лимфоцитов (CD3+) и особенно их субпопуляции Т-хелперов – индукторов (CD4+). Наибольшее снижение этих субпопуляций лимфоцитов наблюдалось у больных с вторичной лекарственной устойчивостью. Иммунорегуляторный индекс (ИРИ), который является соотношением CD4+/CD8+, во всех группах больных был достоверно понижен по отношению к норме. Эти данные отражают неполноценность иммунной защиты организма.

2. Содержание CD8+ и CD16+ лимфоцитов было повышено по сравнению с показателями нормы во всех группах больных туберкулезом легких. Так называемые НК-клетки (CD16+) и цитотоксические Т-лимфоциты (CD8+) принимают участие в неспецифической защите против внутриклеточных МБТ, уничтожая инфицированные возбудителями клетки. Эти лимфоциты способны синтезировать многие виды цитокинов, в том числе ФНО-α [12]. НК-клетки не могут быть отнесены ни к Т-, ни к В-лимфоцитам. Они постоянно присутствуют в организме и играют важную роль в иммунологическом надзоре при разрушении некоторых опухолевых и вирус-инфицированных клеток. НК-клетки оказывают на эти структуры прямое цитотоксическое действие.

Одной из причин дисбаланса иммунологически важных цитокинов (иммуноцитокинов) и, в связи с этим, нарушения регуляции воспалительных процессов может быть выявляемая у таких больных Т-клеточная недостаточность.

#### Выводы

1. У больных инфильтративным туберкулезом легких выявляются в крови высокие концентрации белка острой фазы ИЛ-6. Содержание цитокина ИЛ-6 в общей циркуляции при лекарственной чувствительности выше, чем при лекарственной устойчивости.

2. Концентрация провоспалительного цитокина ФНО-α в крови больных туберкулезом легких с лекарственной чувствительностью повышена, а противовоспалительного цитокина ИЛ-4 снижена.

3. Концентрация цитокина ИЛ-6 в крови больных туберкулезом легких с первичной лекар-

ственной устойчивостью МБТ выше, чем у больных с вторичной лекарственной устойчивостью.

4. У больных с вторичной лекарственной устойчивостью МБТ содержание в крови противовоспалительного цитокина ИЛ-4 снижено относительно его уровня у больных с первичной лекарственной устойчивостью и практически здоровых лиц.

5. Для туберкулеза легких с Т-клеточной недостаточностью иммунитета характерно смещение цитокинового баланса в провоспалительном направлении.

#### Литература

1. Маркелова Е.В., Костюшко А.В., Красников В.Е. Патогенетическая роль нарушений в системе цитокинов при инфекционно-воспалительных заболеваниях // Тихоокеанский медицинский журнал. 2008. № 3. С. 24–29.
2. Фрейдлин И.С. Паракринные и аутокринные механизмы цитокиновой регуляции // Иммунология. 2001. № 5. С.4–7.
3. Китаев М.И., Собуров К.А. Региональные нормы показателей иммунитета и иммуногенетические маркеры у горного населения Кыргызстана. Бишкек, 2009. С. 28.
4. Черешнев В.А., Гусев Е.Ю. Иммунология воспаления, роль цитокинов // Иммунология. 2001. Т. 3. С. 361–364.
5. Urdahl K.B., Liggitt D., Bevan M.J. et al. CD8+ T cells accumulate in the lungs of Mycobacterium tuberculosis-infected mice, but provide minimal protection // J. Immunol. 2003. Vol. 170. № 2. P. 1987–1994.
6. Dai G., Phalet S., McMullrey D. Nutritional modulation of host responses to mycobacteria // Front. Biosci. 1998. P. 110–122.
7. Bowssiotis V., Tsai E., Ynis E. IL-10 – producing T-cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patient // Y. Clin. Invest. 2000. V. 105. № 9. P. 1317–1325.
8. Елькин А.В., Кноринг Б.Е., Иванов Л.А. и др. Комплексное лечение прогрессирующего туберкулеза легких с применением ронколейкина // СПб., 2002. С. 103.
9. Кишкун А.А. Иммунологические и серологические исследования в клинической практике. М.: Изд-во “МИА”. 2006.
10. Wilkinson R.J., Patel P., Luwelin M. et al. Influence of polymorphism in the genes for the interleukin receptor antagonist and IL-1β on tuberculosis // J. Exp. Med. 1999. Vol. 189. № 2. P. 1863–1873.

- 
11. *Balkwill F. Cytokine cell Biology // Oxford University Press, Oxford, England. 2001. P. 272.*
  12. *Новицкий В.В., Сеницина В.А., Воронкова О.В. Цитокинпродуцирующая активность монону-*

*клеарных лейкоцитов периферической крови у больных туберкулезом легких до лечения и на фоне химиотерапии // Проблемы туберкулеза и болезней легких. 2005. № 6. С. 40.*