СТАН СИСТЕМИ ГАММА-ІНТЕРФЕРОНУ У ХВОРИХ НА ДЕСТРУКТИВНИЙ МУЛЬТИРЕЗИСТЕНТНИЙ ТУБЕРКУЛЬОЗ ЛЕГЕНЬ З РІЗНИМИ ВАРІАНТАМИ МОНОНУКЛЕАРНОЇ НЕДОСТАТНОСТІ

Ю. О. Матвієнко, О. М. Рекалова, К. Ф.Чернушенко, О. Р. Панасюкова, Л. П. Кадан, С. Г. Ясир, М. Б. Сінгаєвський, І. В. Копосова, В. М. Петішкіна, А. С. Фірсова

ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України», Київ

Резюме. Обстежені 70 хворих на ДМРТБ і 30 практично здорових осіб у віці від 19 до 57 років, яким проводилось клініко-функціональне та імунологічне дослідження. Визначення порушень стану системи γ-IFN у хворих на ДМРТБ в залежності від виявлених варіантів мононуклеарної недостатності (МІН). Робота виконана за кошти державного бюджету.

Негативні зміни стосовно продукції γ-IFN мононуклеарами периферичної крові у хворих на ДМРТБ супроводжуються значним збільшенням (відносно групи здорових) щільності рецепторів до γ-IFN на лейкоцитах крові: на лімфоцитах – в 1,3 рази, на моноцитах – в 1,7 рази, на гранулоцитах – в 1,2 рази, що відповідає активації цих клітин.

У хворих з найбільш тяжкою формою МІН з поєднанням депресії Т- та В- лімфоцитів та моноцитів простежується відсутність кореляційних зв»язків із активністю фагоцитарних клітин крові, притаманних для ізольованої та нетяжкої комбінованої МІН, що підтверджує наявність глибокої імуносупресії у таких хворих.

Ключові слова: *деструктивний туберкульоз легень із мультирезистентністю до протитуберкульозних ліків, мононуклеарна імунологічна недостатність, система γ-IFN, кореляція.*

СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ ГАММА-ИНТЕРФЕРОНАУ БОЛЬНЫХ НА ДЕСТРУКТИВНЫЙ МУЛЬТИРЕЗИСТЕНТНЫЙ ТУБЕРКУЛЕЗ ЛЕГКИХ С РАЗНЫМИ ВАРИАНТАМИ МОНОНУКЛЕАРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Ю. А. Матвиенко, Е. М. Рекалова, К. Ф.Чернушенко, О. Р. Панасюкова, Л. П. Кадан, С. Г. Ясырь, М. Б. Сингаевский, И. В. Копосова, В. Н. Петишкина, А. С. Фирсова

Резюме. Обследовано 70 больных ДМРТБ и 30 практически здоровых лиц в возрасте от 19 до 57 лет, которым проводились клинико-функциональные и иммунологические исследования. Определение нарушений состояния системы γ-IFN у больных ДМРТБ в зависимости от выявленных вариантов мононуклеарной недостаточности (МИН). Работа выполнена на средства государственного бюджета.

Негативные изменения в отношении продукции γ-IFN мононуклеарами периферической крови у больных ДМРТБ сопровождаются значительным увеличением (относительно группы здоровых) плотности рецепторов γ-IFN на лейкоцитах крови: на лимфоцитах – в 1,3 раза, на моноцитах – в 1,7 раза, на гранулоцитах – в 1,2 раза, что соответствует активации этих клеток.

У больных с наиболее тяжелой формой МИН с сочетанием депрессии Т и В-лимфоцитов и моноцитов прослеживается отсутствие корреляционных связей с активностью фагоцитарных клеток крови, характерных для изолированной и нетяжкие комбинированной МИН, подтверждающий наличие глубокой иммуносупресии у таких больных.

Ключевые слова: *деструктивный туберкулез легких с мультирезистентностью к противотуберкулезным препаратам, мононуклеарная иммунологическая недостаточность, система γ-IFN, корреляция.*

STATE OF GAMMA-INTERFERON SYSTEMS IN PATIENTS WITH MULTIDRUG-RESISTANT DESTRUCTIVE TUBERCULOSIS WITH DIFFERENT VARIANTS OF MONONUCLEAR INSUFFICIENCY

Yu. A. Matvienko, E. M. Rekalova, K. F. Chernushenko, O. R. Panasyukova, L. P. Kadan, S. G. Yassyr, M. B. Singaievskyi, I. V. Koposova, V. M. Petishkina, A. S. Firsova

Summary. Examined 70 patients with DMRTB and 30 healthy individuals aged 19 to 57 years, who underwent clinical and functional and immunological studies. Definition of violations of the system g-IFN in patients DMRTB depending on the options identified mononuclear failure (MIN).This work was funded by the state budget.

Negative change in the product γ-IFN peripheral blood mononuclear cells in patients with DMRTB accompanied by a significant increase (relative to the healthy group) density of receptors for γ-IFN in blood leucocytes: on lymphocytes – 1,3 times,on monocytes – 1,7 times, on granulocytes – 1,2 times, which corresponds to the activation of these cells.

Patients with the most severe depression MIN combination of T- and B- lymphocytes and monocytes observed lack of correlation with activity of phagocytic blood cells, typical for isolated and minor combination MIN certifying profound immunosuppression in these patients.

Key words: *destructive pulmonary tuberculosis of multiresistant to anti-TB drugs, mononuclear immune insufficiency, γ-IFN systems, correlation.*

Адреса для листування: *Рекалова Олена Михайлівна*
ДУ "Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф.Г. Яновського НАМН України"
10, вул. Амосова, м. Київ,
E-mail: ignatieva@ifp.kiev.ua

Актуальність роботи обумовлена зростанням в Україні кількості хворих на деструктивний туберкульоз легень із мультирезистентністю до протитуберкульозних ліків (ДМРТБ), що призводить до стійкого бактеріовиділення та швидкого погіршення стану хворих. Захворювання супроводжується послабленням імунітету – вторинною імунологічною недостатністю [1]. Остання нерідко проявляється порушеннями в системі гама-інтерферону (γ-IFN), який відноситься до ключових цитокінів у патогенезі туберкульозу.

Система γ-IFN складається з самих інтерферонів, їх генів та факторів транскрипції, рецепторів до γ-IFN (IFN-γR1) на клітинах-мішенях, а також ферментних систем, які активуються при взаємодії γ-IFN з рецепторами [2–5]. Виразна імуностимулююча та імунорегуляторна дія γ-IFN лежить і в основі протитуберкульозного імунітету, яка проявляється на усіх етапах його формування [6–9].

Мікобактерії туберкульозу (МБТ) належать до облігатних внутрішньоклітинних патогенів, які у інфікованих осіб можуть тривалий час перебувати у мононуклеарних клітинах і не зумовлювати симптомів захворювання. Це відбувається завдяки здатності їх уникати контролю імунної системи, зокрема з боку системи γ-IFN. Для цього вони використовують різноманітні механізми, що спрямовані на клітини-продуценти γ-IFN, продукцію ними згаданого цитокіну та рецептори до нього на клітинах-мішенях. Відомо, що продуцентами ендогенного γ-IFN, який є одним з основних факторів захисту організму від МБТ, виступають Т-хелпери (CD4+), Т-кілери (CD8+) та NK-клітини (CD16+56+), а його вплив може бути опосередкований функцією мононуклеарних фагоцитів [7].

При туберкульозі порушення в системі γ-IFN можуть проявлятись: зниженням рівня γ-IFN в сироватці крові та в інших біологічних рідинах; зменшенням числа клітин – продуцентів γ-IFN; пригніченням синтезу ними даного цитокіну; зниженням експресії рецепторів до γ-IFN на клітинах - мішенях; модифікацією зазначених рецепторів внаслідок мутацій і впливу МБТ.

Зниження рівня, продукції та рецепції γ-IFN у хворих на туберкульоз призводить до виразних порушень Т-клітинного імунітету, туберкулінової анергії, дисбалансу цитокінів, дисрегуляції апоптозу лімфоїдних і фагоцитуючих клітин, а також зниження цитотоксичного потенціалу специфічних (антитілозалежних) та природних кілерів і гальмування активації макрофагів та моноцитів, внаслідок чого не реалізується внутрішньоклітинний кілінг МБТ, – що створює сприятливі умови для експансії даного патогену, сприяє хронізації інфекції та погіршує стан пацієнтів [4–9].

З іншого боку, продукція γ-IFN залежить від кількості ключових клітин продуцентів, а саме – Th1-лімфоцитів, природних кілерів та макрофагів. Таким чином, можна говорити про наявність хибного кола: наявність мононуклеарної (тобто пов'язаної з депресією функціонування Т- і В-лімфоцитів та мононуклеарних фагоцитів периферичної крові – моноцитів) імунологічної недостатності (МІН) визначає недостатність в системі γ-IFN, яка, в свою чергу, призводить до посилення імуносупресії [7, 8].

Мета роботи – визначення порушень в системі -IFN у хворих на деструктивний мультирезистентний туберкульоз легень в залежності від виявлених варіантів мононуклеарної імунологічної недостатності, які можуть бути обумовлені її різною локалізацією (в Т-, В-лімфоцитах та моноцитах периферичної крові), характером (зміною кількості клітин і/або їх функціональної активності) та виразністю (ступенем імуносупресії).

Робота виконана за кошти державного бюджету.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ.

Дослідження проводились в акредитованій клініці ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України» – акредитаційний сертифікат, вища категорія, серія М3, № 011939, дата видачі сертифікату Головною акредитаційною комісією МОЗ України – 01 квітня 2014 р., реєстраційний номер 8334. Лабораторні дослідження проводились в атестованій лабораторії клінічної імунології (Свідоцтво про атестацію за № ПТ – 464/13, видане ДП «Укрметртестстандарт» 30.12.2013 р. засвідчує, що лабораторія атестована на підставі Закону України «Про метрологію та метрологічну діяльність», відповідає критеріям атестації вимірювальних лабораторій відповідно до вимог Правил уповноваження та атестації в державній метрологічній системі).

Комплексне клініко-імунологічне обстеження було проведено у 70 хворих на ДМРТБ, які проходили стаціонарне лікування в терапевтичних відділеннях НІФП НАМН. Середній вік хворих складав (34,8 ± 1,4) року. Порожнини розпаду, інфільтративні та м'яко вогнищеві утворення і бактеріовиділення з мікробіологічним підтвердженням мультирезистентності збудника було діагностовано у всіх хворих. Контрольну групу склали 30 практично здорових осіб (донорів крові) без клінічних ознак соматичної та інфекційної патології, середній вік – (28,3 ± 1,9) року.

Варіанти МІН визначали за локалізацією, характером та ступенем імунологічних порушень у хворих на ДМРТБ на підставі модифікованих нами [10] класичних критеріїв В. М. Земскова і А. М. Земскова (1996) [11]. Так, МІН І ступеня (компенсовану) ми визначали при зниженні до 33 % від норми не менше 3-х показників, ІІ ступеня (субкомпенсовану) – при зниженні не менше 2-х показників до 33 % від норми, і мінімум одного з них – на 34–66 %, ІІІ ступеня (декомпенсовану) – при зниженні хоча б одного показника на 67 % та більше від показника здорових осіб [10 – 13].

Виявлення імунологічних порушень, які можуть бути обумовлені розладами у системі γ-IFN, визначали за:

- кількістю лімфоцитів та їх субпопуляцій за допомогою двокольорової проточної лазерної цитометрії (проточний цитофлюориметр FACS Calibur (Канада), з використанням моноклональних антитіл до диференціювальних антигенів CD4+8-

лімфоцитів (Лф), CD4–8+-Лф, CD3–19+-Лф, CD3–16+56+-клітин (BECKMAN COULTER, США);

- проліферативною відповіддю Т-клітин на ФГА та БЦЖ в реакції бластоутворення лімфоцитів (РБТЛ) (характеризувала функціональну активність Т-лімфоцитів) [14];
- за рівнями сироваткових імуноглобулінів (Ig) класів A, M, G (характеризували функціональну активність В-лімфоцитів), які визначали методом твердофазного імуноферментного аналізу з використанням комерційних тест-систем «ХЕМА-МЕДІКА», Росія [15];
- рівнем сумарних протитуберкульозних антитіл в сироватці крові (характеризували функціональну активність В-лімфоцитів), який визначали методом імуноферментного аналізу з використанням комерційних тест-систем «Туб-тест IgG Демедітек Діагностикс (GMBH)», Німеччина;
- рівнями циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) середнього та малого розміру у тесті мікропреципітації в поліетиленгліколі (характеризували функціональну активність В-лімфоцитів) з використанням комерційних тест-систем «Хема-Медика» (Росія) і обліком результатів на аналізаторі-спектрофотометрі μQuant (BioTek, США);
- вмістом моноцитів у крові, а також їх здатністю до поглинання тест-об'єктів, мічених флюорохромами, та рівнями їх кисеньзалежного метаболізму – за визначенням спонтанних рівней активних форм кисню (з використанням ДХФДА) та при стимуляції зимозаном, з обчисленням коефіцієнту стимуляції за їх відношенням (характеризували функціональну активність моноцитів), які визначали методом проточної цитофлюориметрії [16].

Виявлення змін безпосередньо у системі γ-IFN визначали за:

1) вмістом γ-IFN в сироватці крові;

2) здатністю лейкоцитів крові in vitro до продукції γ-IFN в плазмі (спонтанної та стимульованої ФГА та БЦЖ), з визначенням концентрації γ-IFN в тестуємій рідині методом імуноферментного аналізу з використанням комерційної тест-системи («Diaclon», Франція) [14–18];

3) середньою здатністю кожної з клітин-продуцентів до синтезу γ-IFN шляхом обчислення рівнів питомої продукції γ-IFN за формулою:

ПП γ-IFN = X / (ACD4 + BCD8 + CCD16), де:

– ПП γ-IFN – питома продукція γ-IFN, або середній рівень продукції γ-IFN кожною клітиною проби (пг*10–6 / клітину);

– X – загальний вміст γ-IFN в пробі (пг);

– (ACD4 + BCD8 + CCD16) – сума абсолютної кількості клітин – основних продуцентів γ-IFN: Т-хелперів (CD4+8-Лф), Т-цитотоксичних клітин (CD4–8+-Лф) та натуральних кілерів (CD3–16+56+-клітин) (клітин * 109/л).

4) щільністю рецепторів до γ-IFN на лейкоцитах крові (CD119+-Лф) методом проточної цитометрії з використанням анти-CD119 моноклональних антитіл (BD Biosciences, США) [16].

Отриманий в ході дослідження цифровий матеріал у кожній окремій вибірці був перевірений та підтверджений на нормальне розподілення величин. Для перевірки нормальності розподілу даних використовували методику Лапач С. Н. та ін. (2001) (функція NORMSAMP-1, яка вбудовується в середовище Excel) [19]. За отриманими результатами визначали вибір методу подальшої статистичної обробки даних для підтвердження вірогідності результатів.

Статистична обробка отриманих даних проводилась методами параметричної (двосторонній t-критерій Ст'юдента) та непараметричної (двовибірковий критерій Уілкоксона) статистики за допомогою ліцензійних програмних продуктів, які входили до пакету Microsoft Office Professional 2007, ліцензія Russian Academic OPEN NoLevel № 43437596. Результати представляли у вигляді n – кількості обстежених хворих у групі, середньоарифметичного значення (M), помилки середньоарифметичного значення (m), медіани (Me), а також у пропорціях і відсотках із зазначенням довірчого інтервалу (ДІ). Обчислювання критеріальних значень проводилось при заданому рівні значимості $p < 0,05$ [19]. При аналізі індивідуальних змін досліджуваних показників було застосовано метод альтернативного варіювання. Перевірка наявності зв`язку між вибірками оцінювалась із застосуванням рангового кореляційного аналізу Спірмена.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.

Серед 70-ти досліджених хворих на ДМРТБ наявність МІН було визначено у 98,6 % пацієнтів. Серед них депресивні зміни (зниження імунологічних показників) в Т-системі імунітету були виявлені у 77,1 % осіб. При цьому ізольовані порушення Т-системи лімфоцитів, які проявлялись або зменшенням кількісних показників (зустрічались найрідше – у 3,7 % хворих, $p < 0,05$), – або пригніченням функціональної активності Т-клітин (за спроможністю лімфоцитів до бластоутворення під впливом ФГА та/або БЦЖ), – у 53,7 % хворих (табл. 1). У решти пацієнтів (32,9 %) недостатність Т-клітинної ланки імунітету мала змішаний характер (скорочення вмісту Т-клітин та/або їх імунорегуляторних субпопуляцій супроводжувалося погіршенням їх функціонування). На цьому фоні компенсовану Т-клітинну МІН (I ступеня), було діагностовано у 38,9 % хворих, у 37,0 % хворих ці зрушення були субкомпенсованими (II ступеня), а глибока (некомпенсована) Т-клітинна МІН (III ступеня) визначалась значно рідше – у 24,1 % осіб ($p < 0,05$, відносно суми кількості хворих з I та II ступенями депресії Т-клітин). Тривалість лікування таких хворих майже не відрізнялась і ліжко-день дорівнював ($6,7 \pm 0,4$) місяця – з I та II ступенями МІН, ($7,0 \pm 0,7$) місяця – з III ступенем МІН.

Ознаки депресії В-системи імунітету виявлялися у 88,6 % осіб. Із них ізольовані порушення у вигляді скорочення чисельності В-клітин було зареєстровано у 25,8 % хворих, а функціональна депресія з наявністю низького титру протитуберкульозних антитіл у сироватці крові – у 24,2 % осіб (див. табл. 1). Значно частіше, ніж кількісна або функціональна

В-клітинна імуносупресія визначалося їх поєднання – у 50,0 % хворих ($p < 0,05$). В-клітинна недостатність I ступеня спостерігалась у 14,5 % хворих, II ступеня – у 17,7 % осіб, але у більшості пацієнтів (у 67,7 %, $p < 0,05$) – вона була глибокою III ступеня у зв'язку з пригніченням синтезу специфічних протитуберкульозних антитіл. Тривалість лікування таких хворих вірогідно не відрізнялась і ліжко-день становив ($7,3 \pm 0,5$) місяця – з I та II ступенями, ($6,3 \pm 0,4$) місяця – з III ступенем.

Недостатність функціонування моноцитів (Мц) була визначена у 75,7 % пацієнтів і проявлялась, або скороченням їх вмісту в крові у 13,2 % хворих, або лише депресією функціональних властивостей (зниженням поглинальної здатності та/або кисень-залежного метаболізму) у 37,7 % хворих, або змішаними порушеннями у 49,1 % хворих (див. табл. 1). У 79,2 % осіб – більшості пацієнтів – моноцитарна недостатність була I-II ступеня, і тільки у 20,8 % чоловік ($p < 0,05$) вона була глибокою – III ступеня, – що супроводжувалось найбільш несприятливим перебігом захворювання з подовженням терміну перебування в стаціонарі до ($8,7 \pm 0,9$) місяця в порівнянні із хворими з моноцитарною недостатністю I-II ступеня, де в середньому вона складала ($6,7 \pm 0,3$) місяця, $p < 0,05$. Отже, з тяжкістю клінічного перебігу захворювання була найбільш пов'язана наявність глибокої моноцитарної недостатності.

Взагалі серед 70 обстежених хворих на ДМРТБ компенсована МІН I ступеня зареєстрована у 7,1 % хворих (ДІ = 2,4-5,9), МІН II ступеня – у 18,6 % хворих (ДІ = 10,3-29,7), але у абсолютної більшості – 72,9 % хворих на ДМРТБ (ДІ = 60,9-82,8) було встановлено МІН III ступеня (рис. 1). Таким чином, МІН спостерігалася майже у всіх хворих на ДМРТБ (в 98,6 % випадків) і в більшості з них вона була глибокою (в 72,9 % осіб, $p < 0,05$).

Ізольовані порушення різних ланок імунітету виявлялися лише у невеликої частини хворих – у 12,9% хворих (ДІ = 6,1-23,0, $p < 0,05$) (рис. 2), серед яких у 4,3 % хворих (ДІ = 0,9-12,1) мала місце лише недостатність Т-системи, у 2,9 % осіб (ДІ = 0,3-9,9) – моноцитарна недостатність, а недостатність тільки В-системи спостерігалася у 5,7 % хворих (ДІ = 1,6-14,0) (рис. 3). Серед решти 85,7 % пацієнта (ДІ = 77,0-93,9) спостерігалася комбінована МІН. У більшості з них – 57,1 % осіб (ДІ = 44,7-68,9, $p < 0,05$) зустрічалось поєднання депресії Т-, В-клітин та фагоцитів, у 14,3 % хворих (ДІ = 7,0-24,7) спостерігалась депресія Т- та В- системи, у 12,9 % осіб (ДІ = 6,1-23,0) – депресія В-системи та моноцитів, і лише в 2,9 % хворих (ДІ = 0,3-9,9) спостерігалась депресія Т-системи і моноцитів. Комбінована депресія супроводжувалось найбільш несприятливим перебігом захворювання з подовженням терміну перебування в стаціонарі до ($7,0 \pm 0,4$) місяця в порівнянні із хворими з ізольованою недостатністю, де в середньому вона складала ($5,1 \pm 1,3$) місяця, $p < 0,05$. Таким чином, у більшості хворих на ДМРТБ ($p < 0,05$) визначалась комбінована МІН, яка здебільшого була виразною та характеризувалася поєднанням депресії Т-, В-клітин і моноцитів та найбільш несприятливим перебігом захворювання.

Рівень -IFN в сироватці крові у хворих на ДМРТБ в середньому становив 11,7 пг/мл, що вірогідно не відрізнялось від референтних значень (табл. 2). Одночасно як спонтанна продукція γ-IFN лейкоцитами крові (яка характеризує існуючу активність клітин-продуцентів γ-IFN), так й індукована ФГА (віддзеркалює спроможність клітин до неспецифічної відповіді) у хворих за середніми показниками теж були у межах референтного діапазону, що могло свідчити про відносну недостатність синтезу γ-IFN клітинами крові, оскільки для елімінації МБТ потрібні підвищені концентрації γ-IFN [20]. Дійсно, зниження показника медіани індукованої ФГА продукції γ-IFN (до 583,3 пг/мл) визначило наявність вірогідного пригнічення спроможності клітин до синтезу γ-IFN у багатьох хворих на ДМРТБ.

Одночасно у хворих на ДМРТБ стимульована БЦЖ продукція γ-IFN мононуклеарами крові, яка характеризує спроможність сенсибілізованих клітин до активності відносно знищення МБТ, мала наступні особливості (див. табл. 2). По-перше, стимульована БЦЖ питома продукція γ-IFN за медіаною була нижчою за значення у здорових осіб (988,5 пг/мл, $p < 0,05$), що, ймовірно, віддзеркалювало виснаження клітин щодо продукції γ-IFN у хворих при їх тривалому подразненні резистентною до ліків МБТ, а також, можливо, було частково обумовлено блокуванням МБТ механізмів виділення γ-IFN. По-друге: у здорових людей за середніми показниками стимульована БЦЖ продукція γ-IFN була вища за стимульовану ФГА у 1,3рази (3038,3 пг/мл / 2203,4 пг/мл), – що свідчило про більш сильну реакцію клітин здорових осіб на МБТ, ніж на неспецифічний подразник. В групі хворих, навпроти, вона була нижчою за стимульовану ФГА продукцію γ-IFN у 1,3 рази(2014,1 пг/мл / 2270,5 пг/мл), що також могло свідчити про негативний вплив МБТ на імунні клітини при ДМРТБ. Переважання у хворих в 1,7 рази показника медіани індукованої БЦЖ продукції -IFN над такою під впливом ФГА (988,5 пг/мл / 583,3 пг/мл), на відміну від групи здорових, в яких ці показники практично рівні (1064,0 пг/мл / 1094,7 пг/мл = 0,97), ймовірно, відображало більш активований стан мононуклеарів відносно МБТ у хворих на ДМРТБ, що підтверджувалось у них коефіцієнтом співвідношення питомої продукції γ-IFN у відповідь на стимуляцію БЦЖ /ФГА (Кст) – більше одиниці ($1,9 \pm 0,7$) у.о.

Відзначимо, що запропонований нами показник питомої продукції γ-IFN мононуклеарами крові відображав всі описані вище клітинні зміни відносно продукції γ-IFN у хворих, але медіана стимульованої БЦЖ продукції γ-IFN була у хворих вірогідно нижчою, ніж у здорових, що визначило наявність вірогідного пригнічення спроможності клітин до вироблення γ-IFN під впливом МБТ у багатьох хворих на ДМРТБ (див. табл. 2). Проаналізувавши в різних групах хворих запропонований нами показник Кст, який характеризував ступінь активації мононуклеарів відносно БЦЖ, ми визначили, що у 67,4 % хворих

він був нижчим за одиницю і сягав (0,4 ± 0,1) у.о., при нормі у здорових осіб (1,6 ± 0,5) у.о., ($p < 0,05$), а тривалість перебування в стаціонарі таких хворих була більшою (7,1 ± 0,4) місяця на відміну від решти хворих (32, 6 %) у яких Кст був більший за одиницю (4,9 ± 1,9) у.о. ($p < 0,05$), тривалість перебування яких в стаціонарі становила (5,8 ± 0,7) місяця, ($p < 0,05$). Це дає змогу використовувати такий показник для прогнозування тяжкості перебігу туберкульозу легень у хворих.

Таким чином, у хворих на ДМРТБ, в основному, визначалося пригнічення відповіді мононуклеарів крові на МБТ (зниження у 67,4 % хворих коефіцієнту співвідношення питомої продукції γ-IFN мононуклеарами у відповідь на стимуляцію БЦЖ/ФГА) на фоні функціонального виснаження цих клітин (зниження стимульованої БЦЖ та ФГА питомої продукції γ-IFN мононуклеарами відносно здорових осіб) при їх триваючій активності (з переважанням медіани індукованої БЦЖ продукції γ-IFN над такою під впливом ФГА). Найбільш негативним для перебігу ДМРТБ було зниження менше одиниці коефіцієнту співвідношення питомої продукції γ-IFN мононуклеарами у відповідь на стимуляцію БЦЖ/ФГА, який характеризував ступінь активації мононуклеарів відносно БЦЖ, що було пов›язаним з подовженням терміну перебування в стаціонарі таких хворих.

Відзначимо, що всі описані негативні зміни стосовно продукції γ-IFN мононуклеарами периферичної крові у хворих на ДМРТБ супроводжувалися значним збільшенням (відносно групи здорових) щільності рецепторів до γ-IFN на лейкоцитах крові (за середніми показниками): на лімфоцитах– в 1,3 рази (26,1у.о. / 20,1у.о.), на моноцитах – в 1,7 рази (97,2 у.о./58,5 у.о.), на гранулоцитах – в 1,2 рази (59,1 у.о./48,1 у.о.) (див. табл. 2), що відповідало активації цих клітин.

Зважаючи на варіабельність проявів МІН у хворих на ДМРТБ, з метою виявлення особливостей продукції γ-IFN при різних варіантах МІН, було проаналізовано стан системи γ-IFN в залежності від виду МІН та її локалізації з використанням коефіцієнту рангової кореляції Спірмена (rs).

При ізольованій (n = 9) формі МІН з найменшою кількістю імунологічних відхилень (ліжко-день хворих складав (5,1 ± 1,3) місяця) рівень γ-IFN в сироватці крові прямо корелював із рівнем протитуберкульозних антитіл ($rs = 0,73$, $p < 0,025$). Це пояснюється тим, що недостатність окремих клітинних ланок (або Т-, або В-лімфоцитів, або моноцитів), ймовірно, була компенсованою іншими ланками імунної системи та не впливала суттєво на функціонування В-лімфоцитів. З іншого боку, сироватковий рівень γ-IFN зворотно корелював із щільністю рецепторів до γ-IFN на лімфоцитах ($rs = -0,85$, $p < 0,025$) та вмістом ЦІК в сироватці крові ($rs = -0,60$, $p < 0,05$). Це, по-перше, віддзеркалювало активацію лімфоцитів крові у відповідь на низькі рівні сироваткового γ-IFN шляхом збільшення рецепторів до γ-IFN на їх поверхні. По-друге, можливо, пояснювалось ефективною елімінацією ЦІК із крові (які складаються із комплексу антиген-антитіло, у тому числі – специфічних) при високому рівні сироваткового γ-IFN шляхом активації фагоцитарних клітин крові. Дійсно, при цій формі МІН спостерігався прямий кореляційний зв›язок між спонтанною продукцією γ-IFN лейкоцитами (яка практично визначає сироватковий рівень γ-IFN) і кількістю клітин, здатних до фагоцитозу та утворення активних форм кисню ($rs = 0,64$ та $rs = 0,59$ відповідно, $p < 0,05$). Одночасно рівень спонтанної продукції γ-IFN прямо корелював із кількістю цитотоксичних (CD8+) лімфоцитів ($rs = 0,87$ та $rs = 0,75$ відповідно, $p < 0,025$), які є продуцентами γ-IFN.

У хворих з комбінацією депресії Т- і В-лімфоцитів (n = 10), при якій ліжко-день хворих складав (7,0 ± 0,4) місяця ($p < 0,05$ відносно ізольованої форми МІН), – подібно хворим з ізольованою МІН, рівень спонтанної продукції γ-IFN прямо корелював із кількістю клітин, здатних до фагоцитозу та утворення активних форм кисню ($rs = 0,64$ та $rs = 0,59$ відповідно, $p < 0,05$) та з величиною коефіцієнту стимуляції моноцитів ($rs = 0,78$, $p < 0,025$), який характеризує їх функціональні резерви. Також сироватковий рівень γ-IFN був прямо зв'язаний з кількістю природних кілерів (CD3–16+56+-клітин) ($rs = 0,74$, $p < 0,025$), які є однією із складових пулу продуцентів цього цитокіну, а спонтанна продукція γ-IFN лейкоцитами корелювала з загальною кількістю Т-лімфоцитів (CD3+-Лф) ($rs = 0,73$, $p < 0,025$). При цьому рівень γ-IFN також зворотно корелював із вмістом ЦІК в сироватці крові ($rs = -0,57$ та $rs = -0,65$ відповідно середніх та малих, $p < 0,025$).

У хворих з поєднанням депресії моноцитів та В- лімфоцитів (n = 9), при якій ліжко-день хворих складав (6,8 ± 0,8) місяця, – рівень γ-IFN в сироватці крові та спонтанна продукція γ-IFN моноуклеарами прямо корелювали із кількістю моноцитів, здатних до фагоцитозу (відповідно $rs = 0,73$, $p < 0,025$ та $rs = 0,83$, $p < 0,025$).

У хворих з найбільш тяжкою формою МІН з поєднанням депресії Т-, В- лімфоцитів та моноцитів (n = 40), при якій ліжко-день хворих складав (6,8 ± 0,3) місяця ($p < 0,05$ відносно ізольованої форми МІН), аналогічно попереднім формам МІН, – сироватковий вміст γ-IFN був прямо зв'язаний з кількістю Т-лімфоцитів в крові (CD3+-Лф) ($rs = 0,29$, $p < 0,05$) та природних кілерів (CD3–16+56+-клітин) ($rs = 0,27$, $p < 0,05$), які продукують γ-IFN. Визначався також зворотний зв›язок сироваткового вмісту γ-IFN із кількістю рецепторів до γ-IFN на лімфоцитах ($rs = -0,28$, $p < 0,05$) та вмістом середніх ЦІК ($rs = -0,26$, $p < 0,05$). Характерною для цієї форми МІН був прямий зв›язок спонтанної продукції γ-IFN мононуклеарами зі специфічною відповіддю (РБТЛ) лімфоцитів на БЦЖ ($rs = 0,36$, $p < 0,05$), що відображало зв'язок спонтанної продукції γ-IFN мононуклеарами з їх спроможністю знищувати МБТ. Відсутність позитивних зв›язків рівнів γ-IFN з іншими показниками, які характеризують систему фагоцитів, свідчила про більш глибокий рівень імуносупресії цього контингенту хворих.

Таким чином, при різних формах МІН були встановлені характерні прямі кореляційні зв›язки рівня продукції сироваткового/спонтанного g-IFN з кількістю клітин-продуцентів g-IFN (CD8+ при ізольованій МІН, CD3–16+56+ – при комбінованій Мц+Т+В МІН), з активністю фагоцитів крові (при ізольованій, комбінованій Т+В та Мц+В МІН), рівнем протитуберкульозних антитіл (при ізольованій МІН), та зворотні кореляційні зв›язки з рівнем сироваткових ЦІК (при ізольованій, комбінованій Т+В та Мц+Т+В МІН) і щільністю рецепторів до g-IFN на лейкоцитах (при ізольованій та комбінованій Мц+Т+В МІН).

Отже, характерним для ізольованої МІН є наявність прямих кореляційних зв'язків рівня γ-IFN із рівнем протитуберкульозних антитіл, кількістю клітин, здатних до фагоцитозу та утворення активних форм кисню та кількістю цитотоксичних (CD8+) лімфоцитів, які є продуцентами γ-IFN і зворотнім – з щільністю рецепторів до γ-IFN на лейкоцитах крові. У хворих із комбінованою МІН встановлено наявність прямих кореляційних зв'язків рівня γ-IFN подібних до таких із ізольованою МІН, але у хворих з найбільш тяжкою формою МІН з поєднанням депресії Т-, В- лімфоцитів та моноцитів простежується прямий кореляційний зв'язок продукції γ-IFN мононуклеарами з їх спроможністю знищувати мікобактерії туберкульозу (з показником РБТЛ з БЦЖ), а також відсутність зв›язків з активністю фагоцитарних клітин крові, що підтверджує наявність глибокої імуносупресії у таких хворих.

ВИСНОВКИ

1. Мононуклеарна імунологічна недостатність спостерігається майже у всіх хворих на ДМРТБ (в 99% випадків), і в 73 % випадків вона є глибокою (III ступеня) комбінованою з поєднанням депресії Т-, В- клітин та моноцитів (57 %) та обумовлює найбільш несприятливий перебіг захворювання з подовженням термінів перебування хворих в стаціонарі до (7,0 ± 0,4) місяця (при найбільш сприятливій ізольованій МІН – (5,1 ± 1,3) місяця, $p < 0,05$).
2. При ДМРТБ найбільш глибока (III ступеня) МІН найчастіше спостерігається у В-клітинній ланці імунітету (у 89 % хворих), з них у 67 % – з пригніченням синтезу протитуберкульозних антитіл; глибока Т-клітинна депресія реєструється у 24 %, депресія моноцитів – у 21 % хворих, причому найбільш тяжкий клінічний перебіг ДМРТБ з подовженням термінів перебування в стаціонарі до (8,7 ± 0,9) місяця ($p < 0,05$) пов›язаний з наявністю III ступеня депресії моноцитів, яка обумовлює наявність виразних порушень у системі γ-IFN.
3. У 67 % хворих на ДМРТБ визначаються виразні порушення у системі g-IFN з пригніченням питомої стимульованої БЦЖ продукції γ-IFN мононуклеарами крові, зі зниженням коефіцієнту співвідношення питомої продукції γ-IFN мононуклеарами у відповідь на стимуляцію БЦЖ/ФГА, Кст менше одиниці – (0,4 ± 0,1) у.о. проти (1,6 ± 0,5) у.о. у здорових, $p < 0,05$, – що характеризує наявність вірогідного пригнічення спроможності клітин до вироблення γ-IFN на фоні функціонального виснаження та триваючої активації клітин та обумовлює подовження терміну перебування в стаціонарі хворих до (7,1 ± 0,4) місяця, (проти (5,8 ± 0,7) місяця при Кст > 1, $p < 0,05$); це дає змогу використовувати зниження значень Кст< 1 для прогнозування тяжкості перебігу туберкульозу легень у хворих.
4. Негативні зміни стосовно продукції γ-IFN мононуклеарами периферичної крові у хворих на ДМРТБ супроводжуються значним збільшенням (відносно групи здорових) щільності рецепторів до γ-IFN на лейкоцитах крові: на лімфоцитах – в 1,3 рази, на моноцитах – в 1,7 рази, на гранулоцитах – в 1,2 рази, що відповідає активації цих клітин.
5. У хворих з найбільш тяжкою формою МІН з поєднанням депресії Т- та В- лімфоцитів та моноцитів простежується відсутність кореляційних зв›язків із активністю фагоцитарних клітин крові, притаманних для ізольованої та нетяжкої комбінованої МІН, що підтверджує наявність глибокої імуносупресії у таких хворих.

ЛІТЕРАТУРНІ ДЖЕРЕЛА

6. Пликанчук, О. В. Ефективність імуномодулятора ліастен у лікуванні хворих на туберкульоз легень [Текст] / О. В. Пликанчук, С. В. Зайков // Імунологія та алергологія. – 2007. – № 3. – С. 111.
7. Flynn, J. L. Immunology of tuberculosis [Text] / J. L. Flynn, J. Chan // Annual Rev. Immunol. – 2001. – № 19. – P. 93–129.
8. Alvarez, D. V. Interferon Gamma : [Електрон. ресурс] / D. V. Alvarez // Department of Biology, Davidson College, Davidson, NC 28036. – 2005. – Режим доступу : http://www.bio.davidson.edu/courses/immunology/Students/spring2006/V_Alvarez/IFN-gamma.html
9. Фещенко, Ю.І. Хіміорезистентний туберкульоз [Текст] / Ю. І. Фещенко, В. М. Мельник, А. В. Коблянська.– Київ: Здоровья,2003.– с. 134.
10. Hestvik, A. L. Mycobacterial manipulation of the host cell [Text] / A. L. Hestvik, Z. Hmama, Y. Av-Gay // FEMS Microbiol. Rev. – 2005. – № 5. – P. 1041–1050.
11. Ільїнська, І. Ф. Актуальні питання інтерферонотерапії при туберкульозі [Текст] / І. Ф. Ільїнська // Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія. – 2012. – № 3. – С. 18–22.
12. Ільїнська, І. Ф. Система γ-інтерферону та її місце у патогенезі туберкульозу [Текст] / І. Ф. Ільїнська // Туберкульоз. Легенві хвороби. ВІЛ-інфекція. – 2012. – № 3. – С. 82–88.
13. Disseminated Tuberculosis in Interferon 7 Gene-disrupted Mice [Text] / A. M. Cooper [et al.] // J. Exp. Med. – 2008. – Vol. 178. – P. 2243–2247.
14. Autoantibodies to interferon-γ in a patient with selective susceptibility to mycobacterial infection and organ-specific autoimmunity [Text] / E. Jouanguy [et al.] // Clin. Infect. Dis. – 2004. – Vol. 38. – P. 10–14.
15. Ільїнська, І. Ф. Варіанти імунологічної недостатності при туберкульозі : [Електрон. ресурс] / І. Ф. Ільїнська. – Режим доступу : http: //ifp.pulm/doc/staff/ilyinskaya2008-1.pps16
16. Земсков, В. М. Принципы дифференцированной иммунокоррекции [Текст] / В. М. Земсков, А. М. Земсков // Иммунология. – 1996. – № 3. – С. 4–6.
17. Ільїнська, І. Ф. Преморбідна імунологічна недостатність у хворих на туберкульоз легень [Текст] / І. Ф. Ільїнська // Лаб. діагностика. – 2009. – № 4. – С. 17–23.

18. Ільїнська, І. Ф. Варіанти вторинної імунологічної недостатності, їх діагностичні критерії та принципи імунокорекції (аналітичний огляд) [Текст] / І. Ф. Ільїнська // Лаб. діагностика. – 2010. – № 4. – С. 17–23.
19. Григорьева, М. П. Разработка микромодификации культивирования клеток крови человека [Текст] / М. П. Григорьева, Копелян И. И // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 1972. – Т 74, № 8. – С. 119–122.
20. Система цитокинов, комплемента и современные методы иммунного анализа [Текст] / Л. В. Ковальчук [и др.]. – М.: Изд-во Российского гос. Мед. Ун-та., 2001. – 81 с.
21. Применение проточной цитометрии для оценки функциональной активности иммунной системы человека [Текст]:пособие для врачей-лаборантов /Б. В. Пинегин [и др.]. – М.:Государственный научный центр РФ, 2001. – 53 с.
22. Interferon-gamma: anover view of signals, mechanisms and functions [Text] / K. Schroder [etal.] // J. Leukoc. Biol. – 2004. – Vol.75. – P. 163–189.
23. Современный подход к иммунологической диагностике туберкулезной инфекции у детей и подростков [Текст] / Л. И. Мордовская [и др.] // Дальневосточный медицинский журнал. – 2009. – № 4. – С. 37–39.
24. Лапач, С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel [Текст] / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – Киев : Морион, 2000. – 320 с.
25. Lee, J., Kornfeld, H. Interferon-γ Regulates the Death of M.tuberculosis-Infected Macrophages // J. of Cell Death. – 2010. – № 3. – P. 1–11.