

Zborník: „Mechanizmus pôsobenia a klinické použitie POLYOXIDONIA“. Publikácia No.3, Moskva 2004, st.62-66; Štátny vedecký ústav - Inštitút imunológie MZ RF, Moskva

Komogorova E.E.* , Kostenko E.V.** , Stachanov V.A.** , Naumova A.N.*** , Mišin V.V.***
Pinegin B.V.*

Stanovenie množstva CD3+ lymfocytov, obsahujúcich IFN- γ u chorých na tuberkulózu pľúc a jeho zmena po zapojení polyoxidonia do komplexnej terapie.

*Štátny vedecký ústav - Inštitút imunológie MZ RF, Moskva;

**Vedecký výskumný ústav tuberkulózy, Moskva

*** Ruska štátna univerzita medicíny, katedra tuberkulózy, Moskva

Podľa moderných predstáv, pri formovaní imunity na tuberkulóznou infekciu, hrajú alveolárne makrofágy a rôzne subpopulácie T-buniek kľúčovú úlohu. Výsledok interakcie makrofágov a mykobaktérií závisí na bilancii antimikrobialnej aktivity fagocytárnych buniek a rezistencie mykobaktérii k baktericídnejmu pôsobeniu makrofágov. Pritom dôležitú úlohu v populácii antimikrobialnej aktivity makrofágov plnia Th1- bunky, ktoré produkujú cytokíny; hlavne tie, ktoré sú vlastné tejto populácii: IL-2, IFN- γ , TNF- α (tumor nekrotyzujúci faktor), lymfotoxin (TNF- β), GM-CSF (faktor stimulujúci kolónie granulocytov a makrofágov), (3,5,8). Z tohoto kompletu cytokínov na realizáciu imunitnej reakcie proti mykobaktérii tuberkulózy je zvlášť dôležitý IFN- γ . Tieto cytokíny v kooperácii vyvolávajú silnú aktiváciu makrofágov a stimulujú ich schopnosť „zabíjať“ mikroorganizmy. Základnými prejavmi stimulácie slúži zosilnenie splynutia fagozomu s lyzozómami, tvorba aktívnych foriem kyslíka a kysličníka dusnatého (NO), ako aj sekrécia zápalových cytokínov (1,2,4).

Množstvo Th1- buniek v periférnej krvi sa mení pri rôznych stavov, ktoré sú spojené s poruchami fungovania imunitného systému, ako sú alergické, autoimunitné ochorenia, imunodeficitné stavy. Zvlášť vysoký diagnostický a prognostický význam môžu mať dynamické pozorovania zmeny obsahu Th1- lymfocytov (3,5,6).

Cieľom našej práce bolo skúmanie obsahu DC3+ lymfocytov, ktoré produkujú IFN- γ u chorých na rôzne formy TBC pľúc. Zároveň sme sledovali vplyv imunomodulátora polyoxidonia (PO) na tento ukazovateľ, ktorý sme zapojili do komplexnej terapie u chorých s infiltračnou tuberkulózou pľúc.

Materiály a metódy

V súlade s úlohami výskumu bolo do komplexného klinicko-imunologického sledovania zapojených 42 pacientov s rôznymi formami aktívnej tuberkulózy pľúc: 24 - s infiltračnou tuberkulózou pľúc, 9 - s fibrozno-kavernóznou, 4 - s disseminovanou a 5 - s kaveóznou pneumóniou.

Prítomnosť vyjadrenia intoxikácie je vylučovanie baktérií, deštrukčné zmeny a značné rozšírenie procesu v pľúcach čo zodpovedalo 73,6%, 69,7% a 58,0% u chorých na infiltratívnu tuberkulózu pľúc. Medzi pacientmi na fibróznokavernóznou tuberkulózou intoxikačný syndróm a vylučovanie baktérií bolo zistené v 81,5% a 79,3% resp. prípadoch. U

všetkých pacientov bol to veľmi rozšírený proces (≥ 3 segmentový). Pre všetkých pacientov na disseminovanú tuberkulózu je charakteristická prítomnosť intoxikácie, ako aj veľké zmeny v pľúcach. Vylučovanie baktérií a rozpad bol zaregistrovaný u 83,0 % pacientov. Pacienti s kazeóznou pneumóniou predstavovali klinickú skupinu s najvyšším stupňom obťažnosti, ktorá je charakteristická v každom prípade prítomnosťou prejavujúcou sa intoxikáciou masívneho vylučovania baktérií ako aj podstatným rozpadom pľúcneho tkaniva a dlhotrvajúcim pľúcnym procesom.

Doba ochorenia na TBC bola od 1 mesiaca po 10 a viacej rokov. Vek pacientov bol v medziach od 18 do 60 rokov. Väčšina z nich boli práceschopní vo veku od 20 do 40 rokov. Mužov bolo 21 osôb (70%), ženy - 14 osôb (30%). Dárcovskú skupinu predstavovalo 28 prakticky zdravých osôb vo veku od 15 do 55 rokov.

S cieľom skúmania klinicko-imunologickej efektívnosti PO u pacientov s TBC pľúc boli sformované 2 skupiny pacientov: základná - 12 osôb a kontrolná - 7 osôb. Obidve skupiny predstavovali osoby vo veku od 20 do 60 rokov, 72%-muži a 28%-ženy. Pacientom základnej skupiny vedľa antibakteriálneho liečenia sa vykonávala aj terapia polyoxidoniom (6mg i.m. 2-krát týždenne, celková dávka 10 injekcií). Pacienti kontrolnej skupiny dostávali iba špecifickú protituberkulóznú chémotherapiu. Schémy protituberkulózneho liečenia boli podobné u oboch skupín pacientov tak u základnej ako aj u kontrolnej skupiny.

Mononukleárne bunky periférnej krvi boli separované podľa metódy A. Boyum na jednostupňovom hustotnom gradiente ficoll - pague ($\rho=1,077$; „Pharmacia“). Následne sme ich aktivovali forbolmyristyl acetatom (FMA, „Sigma“) v koncentrácii 10 ng/ml a ionomycinom Ca (Sigma), 1mM v prítomnosti inhibítora aparátu Golgi brefeldina A („Sigma“) v priebehu 5 hodín v úplnom kulturálnom prostredí, ktoré sa skladalo z prostredia RPMI 1640 („Flow“) s pridaním embryonálneho teľacieho séra („Sigma“), 2mM L-glutamínu (Sigma), 20 mM HEPES - pufru („Sigma“) a 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamycinu („Pharmacia“). Inkubácia sa vykonávala pri 37°C v atmosfére 5 % CO₂. Bunky sme farbili v priebehu 20 minút pomocou FITC-značkových CD3 protilátok („Sigma“), ktoré sú povrchovými markermi T-lymfocytov. Následne sme ich permeabilizovali v priebehu 20 minút pri izbovej teplote v 0,1% roztoku saponinu („Sigma“) vo fosfátno - soľnom pufrí s pridaním 1% embryonálneho teľacieho séra („Sigma“). Po permeabilizácii a premytí sme inkubovali s PE - značkovými protilátkami k IFN- γ (Sigma).

Analýza vzoriek sa vykonávala na prietokovom cytometre FACSCalibur (Becton Dickinson) v programe CELL-QUEST tak, aby v okne sa umiestnil oblak lymfocytov. Nastavenie zosilňovača FL1 a FL2 sme upravili tak, aby fluoreskujúce a nefluoreskujúce bunky sa nachádzali na opačných stranách 10. kanálu (7,8).

Výsledky a diskusia

Výsledky vykonaných výskumov ukázali, že samotný nízky obsah CD3+ lymfocytov, ktoré produkovali IFN- γ , sme stanovili u pacientov s najťažšími formami TBC ako je disseminovaná tuberkulóza pľúc ($9,7 \pm 2,7\%$) a kazeózna pneumónia ($7,1 \pm 3,4\%$). Pri infiltráčnej a fibrózno-kaveózne forme boli vyššie a zodpovedali $16,2 \pm 8,1\%$ a $12,5 \pm 4,8\%$. Pri všetkých TBC pľúc hladina CD3+ lymfocytov, ktoré obsahovali IFN- γ bola signifikantne nižšia ako u zdravých darcov u ktorých tento ukazovateľ predstavoval $28,0 \pm 7,2\%$.

Priemerný ukazovateľ CD3+ lymfocytov, ktoré produkovali IFN- γ u pacientov v pokusnej a kontrolnej skupine pred liečením PO bol signifikantne nižší v porovnaní so zdravými darcami ($13,0 \pm 7,7\%$, $10,0 \pm 3,0\%$ a $22,8 \pm 5,2\%$). Po liečení polyoxidoniom

počet CD3+ lymfocytov, produkujúcich IFN- γ , stimulovaných FMA sa zvýšil a hladina obsahu týchto buniek bola skoro ako u darcov, čo predstavovalo $20,0 \pm 7,2\%$. Po mesiaci tento ukazovateľ sa zachoval na normálnej úrovni $19,0 \pm 6,5\%$. Pritom u pacientov s obsahom CD3+ lymfocytov, produkujúcich IFN- γ , viac ako 20 % zních po liečbe polyoxidoniom sa tento ukazovateľ nemenil. V kontrolnej skupine obsah CD3+ lymfocytov, produkujúcich IFN- γ , prakticky zostal na rovnakej úrovni, ako pred liečbou ($11,5 \pm 2,5\%$).

Takto sa preukázalo, že u pacientov na TBC pľúc bol znížený v porovnaní so zdravými darcami, obsah CD3+ lymfocytov produkujúcich IFN- γ , pričom sa ich množstvo menilo v závislosti od formy TBC. Najnižšie hodnoty boli stanovené u pacientov s ťažkými a dlhotrvajúcimi formami. Zapojenie imunomodulátora polyoxidonia do terapie u pacientov chorých na infiltratívnu TBC pľúc, viedlo k zvýšeniu hladiny obsahu CD3+ lymfocytov, ktoré produkujú IFN- γ .

Tab. 1 Ukazovatele hladiny CD3+ lymfocytov produkujúcich IFN- γ u pacientov s rôznymi formami tuberkulózy pľúc.

Ukazovateľ	Infiltračná	Fibrozo-kavernózna	Diseminovaná	Kaveóznopneumónia	Donory
	n = 24	n = 9	n = 4	n = 5	n = 28
CD3+ IFN- γ bunky, %	$16,2 \pm 8,1^*$	$12,5 \pm 4,8^*$	$9,7 \pm 2,7^{**}$	$7,1 \pm 3,4^{**}$	$28,0 \pm 7,2$

*- $p < 0,005$ **- $p < 0,001$ signifikantné rozdiely v porovnaní s donormi

Tab. 2 Vplyv polyoxidonia na obsah CD3+ lymfocytov, produkujúcich IFN- γ , u pacientov chorých na infiltratívnu tuberkulózu pľúc.

Ukazovateľ	Kontrolná skupina		Sledovaná skupina	
	do liečenia	po liečení	do liečenia	po liečení
CD3+ IFN- γ bunky, %	$10,0 \pm 3,0$	$11,5 \pm 2,5$	$13,0 \pm 7,7$	$20,0 \pm 7,2^*$

*- $p < 0,001$ signifikantný rozdiel v porovnaní s hodnotami do liečby

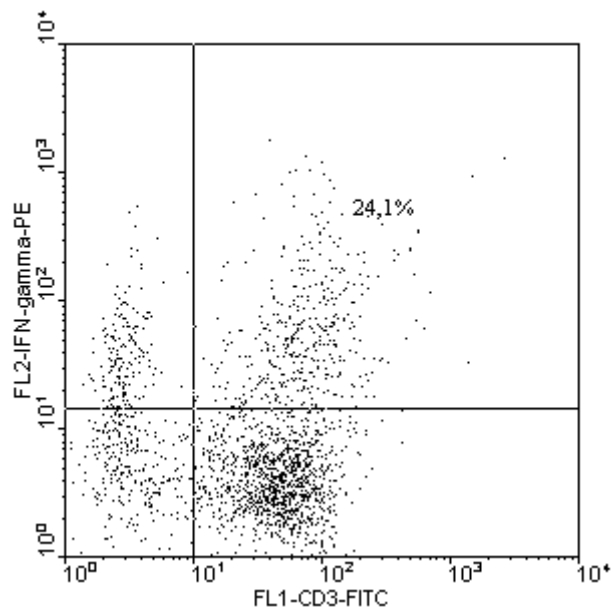
Obr. 1 Analýza lymfocytov značených fluoreskujúcim MAT k CD3 i k INF- γ na laserovom prietokovom cytometre.

Rozloženie buniek v obrázku je podľa intenzity fluorescencie v FL1 (osa abscis, log. hodnota) a v FL2 (osa ordinát, log. hod.). FL –CD3-FITC, FL2-IFN- γ -PE

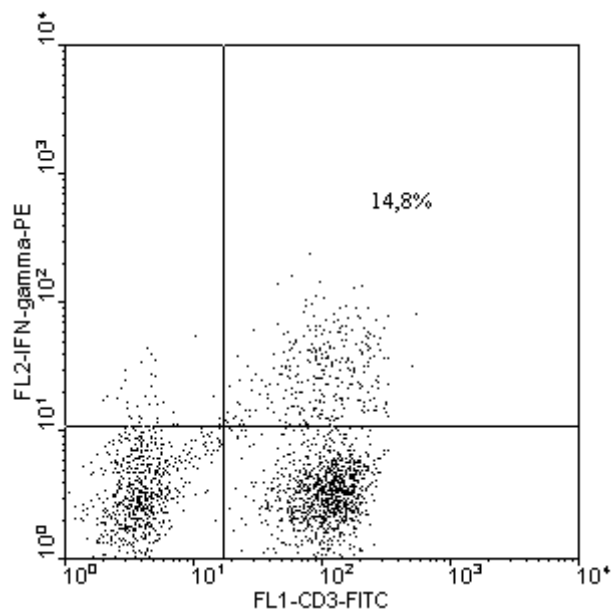
A - analýza lymfocytov donora

B - analýza lymfocytov pacienta infiltratívnou tuberkulózou pľúc

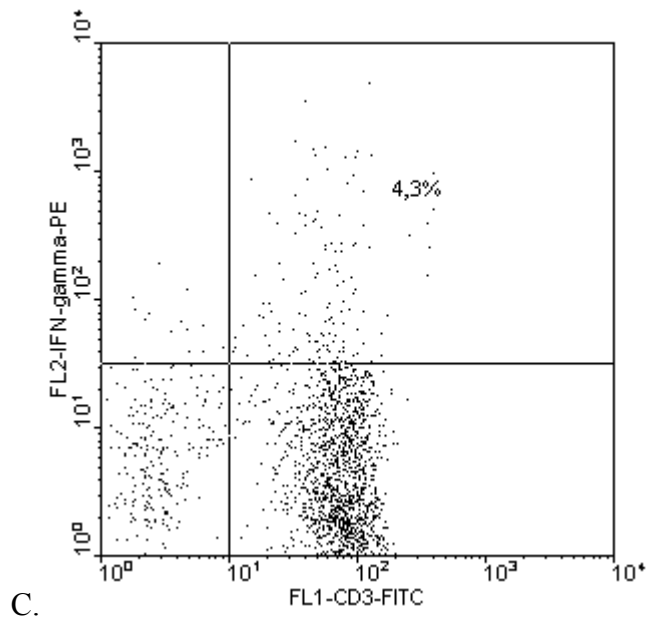
C - analýza lymfocytov pacienta kazeóznou pneumóniou



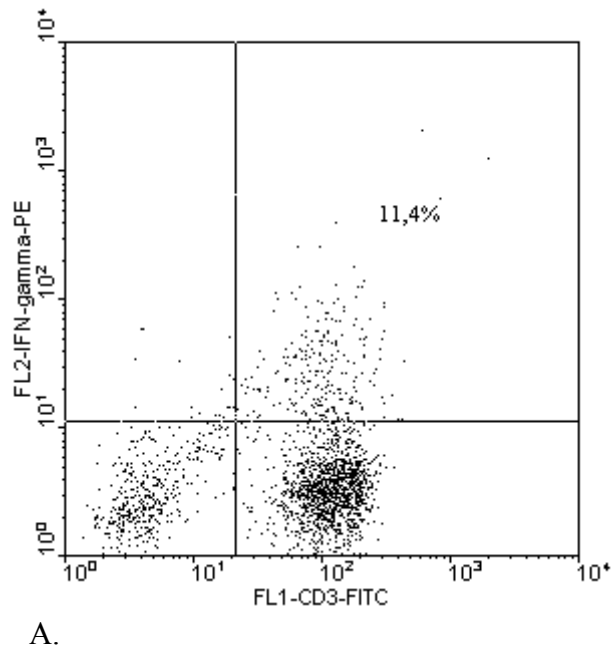
A.

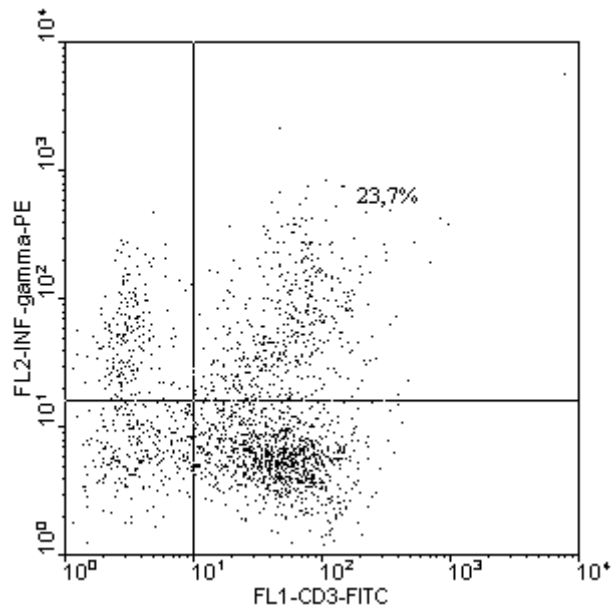


B.



Obr.2 Analýza lymfocytov značených MAT k CD3 a k IFN- γ u chorých infiltratívnou tuberkulózou pľúc do a po liečbe s polyoxidoniom.
 Rozloženie buniek v obrázku je podľa intenzity fluorescencie v FL1 (osa abscis, log. hod.) a k FL2 (osa ordinát, log. hod.). FL1-CD3-FITC; FL2-IFN- γ -PE.
 A – do liečby
 B – po liečbe





B.

Literatúra

- 1., Knoring B.E., Frejdlin I.S., Simbircev A.S., et al.
Charakter špecifickej imunologickej reakcie a produkcia cytokinov mononukleárnymi krvnými bunkami pacientov chorých na rozličné formy tuberkulózy pľúc.
Medicinskaja immunologia. 2001. Tom 3, No.1, str. 61-68
- 2., Salina T.J., Chudzik L.B.,
Immunopatogenetické mechanizmy v priebehu tuberkulózneho procesu.
Problemy tuberkulózy . 2001. No.8 str. 32-34
- 3., Jarilin A.A.,
Základy immunologie. 1999
- 4., Esper G.Kallas, David C. Gibbons, Harold Soucier, Theresa Fitzgerald, John J. Treanor, and Thomas G. Evans,
Detection of intracellular antigen-specific cytokines in human T-cell populations.
J. of Infect. Dis. 1999, Vol. 179, p. 1124-31
- 5., Janis E. Wigginton and Denise Kirschner.
A model to predict cell-mediated immune regulatory mechanisms during human infection with Mycobacterium tuberculosis.
J. of Immunol. 2001. P. 1951-66
- 6., Jo Anne L., Flynn and John Chan.
Immunology of tuberculosis.
Annu.Rev. Immunol. 2001. Vol. 19, p.93-129
- 7., Jun Wang, Julia Wakehan, Robin Harkness and Zhou Xing
Macrophages are a significant source of type 1 cytokines during mycobacterial infection.
J. of Clin. Investig. 1999. No.7 p.1023-29
- 8., M. Garcia, J.A. Vargas, R. Castejon, E. Navas, A. Durantez.
Flow-cytometric assessment of lymphocyte cytokine production in tuberculosis.
Tuberculosis. 2002. P.37-41

