

Jolanta Winek¹, Urszula Demkow², Ewa Rowińska-Zakrzewska¹, Małgorzata Szołkowska¹,
Małgorzata Filewska¹, Jacek Jagodziński³, Kazimierz Roszkowski-Śliż¹

¹Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie

²Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Klinicznej Uniwersytetu Warszawskiego

³Mazowieckie Centrum Leczenia Chorób Płuc w Otwocku

Odpowiedź Th1-Th2 u chorych na gruźlicę oraz osób zdrowych pozostających z nimi w styczności

Comparison of Th1 and Th2 response in the blood of tuberculous patients and healthy contacts

Abstract

Introduction: Th1 response is known to play a dominant role in the resistance to tuberculosis. Nevertheless, IFN γ levels are frequently increased in tuberculous patients, especially at the site of the disease. It is also possible that the shift toward Th2 response is responsible for the loss of resistance.

The aim of this study was to compare the Th1 function of peripheral blood cells and the levels of antimycobacterial antibodies in the serum of culture positive tuberculosis patients and healthy tuberculosis (Tb) contacts. The correlation between the levels of antimycobacterial antibodies and Th1 function of blood cells was also evaluated.

Material and methods: The material consisted of 51 tuberculous patients and 20 healthy persons, close contacts of tuberculosis patients. The ability of peripheral blood cells to secrete IFN γ and IL-2 was estimated in whole blood cultures with PHA, PWM and tuberculin. The levels of IFN gamma and IL-2 in the supernatants of cultures was estimated via a commercial ELISA test. The levels of antimycobacterial antibodies was measured with commercial immunoenzymatic kits detecting IgG antibodies against 38 kDa + 16 kDa and IgG, IgA and IgM antibodies to 38 kDa + lipoarabinomannan (LAM).

Results: No difference was found in the secretion of IFN γ and IL-2 after stimulation with PHA and PWM between the patients and contacts. The secretion of IFN γ after stimulation with tuberculin was even greater in tuberculous patients than in contacts. The levels of IgG and IgA (38 kDa + LAM) were higher in tuberculous patients than in contacts. There was a negative correlation between the level of IgG anti 38 kDa + LAM and the ability of peripheral blood cells to secrete IFN γ after non-specific stimulation in patients with tuberculosis.

Conclusions: Our study confirms the hypothesis that it is not the diminished production of Th1 cytokines, but rather the parallel overproduction of Th2 cytokines, which are essential in the development of tuberculosis.

Key words: Th-1, Th2 response in tuberculosis, IFN γ , IL-2, antimycobacterial antibodies

Pneumonol. Alergol. Pol. 2009; 77: 446–452

Streszczenie

Wstęp: Wzrost odpowiedzi Th1 uznano za kluczowy w zapobieganiu aktywnej chorobie po zakażeniu prątkiem gruźlicy. Tym niemniej, wśród chorych na gruźlicę często stwierdza się zwiększoną sekrecję IFN γ , zwłaszcza w miejscu toczącego się procesu zapalnego. Wydaje się prawdopodobne, że za zachorowanie odpowiada — obok osłabionej odpowiedzi Th1 — wzmożona odpowiedź typu Th2.

Przedmiotem pracy była ocena i porównanie odpowiedzi Th1 komórek krwi obwodowej oraz produkcji przeciwciał przeciwprątkowych w surowicy chorych na gruźlicę oraz zdrowych pozostających z nimi w styczności.

Materiał i metody: Materiał stanowiła krew obwodowa pochodząca od 51 chorych z bakteriologicznie potwierdzoną gruźlicą oraz 20 zdrowych pozostających z nimi w bliskiej styczności. W celu oceny odpowiedzi Th1 zbadano stymulowane PWM, PHA

Adres do korespondencji: dr n. med. Jolanta Winek, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, ul. Płocka 26, 01–138 Warszawa, tel.: (022) 431 22 18, faks: (022) 431 24 08, e-mail: j.winek@igichp.edu.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 10.04.2009 r.

Copyright © 2009 Via Medica

ISSN 0867–7077

i tuberkuliną wydzielenie IL-2 i IFN γ przez komórki krwi pełnej. Do określenia poziomu cytokin w supernatancie hodowli użyto komercyjnego testu ELISA. W badanych grupach, przy użyciu dwóch testów immunoenzymatycznych wykonano jednocześnie oznaczenia poziomu przeciwciał IgG anty 38 kDa + 16 kDa oraz IgG, IgA i IgM anty 38 kDa + lipoarabinomannan.

Wyniki: Nie stwierdzono istotnych różnic w sekrecji IL-2 i IFN γ pod wpływem stymulacji PWM i PHA u chorych na gruźlicę oraz osób zdrowych. Zaobserwowano natomiast, że pod wpływem tuberkuliny wydzielenie IFN γ było istotnie wyższe w grupie chorych. Jednocześnie w tej grupie obserwowano istotnie wyższy poziom przeciwciał klasy IgG oraz IgA anty 38 kDa + LAM. Wśród chorych na gruźlicę stwierdzano także ujemną korelację pomiędzy niespecyficzną stymulowaną sekrecją IFN γ a produkcją przeciwciał klasy IgG anty 38 kDa + LAM.

Wnioski: Przeprowadzone badanie wydaje się potwierdzać hipotezę, iż kluczowym dla rozwoju gruźlicy jest równoległy, obok spadku odpowiedzi Th1, wzrost odpowiedzi Th2.

Słowa kluczowe: odpowiedź Th1-Th2 w gruźlicy, IFN γ , IL-2, przeciwciała przeciwprątkowe

Pneumonol. Alergol. Pol. 2009; 77: 446–452

Wstęp

Powszechnie wiadomo, że do zachorowania na gruźlicę dochodzi u około 10% osób zakażonych. Wiele faktów wskazuje, iż główną cytokiną odpowiedzialną za ten fenomen jest IFN gamma (IFN γ). Silnie przemawia za tym zjawisko wysokiej podatności na infekcje mikobakteryjne osób z genetycznie uwarunkowanym zaburzeniem osi IFN γ - IL-12 [1]. Z drugiej strony, chorzy na gruźlicę mogą wykazywać, zwłaszcza w miejscu toczącego się procesu zapalnego, wzmoczenie odpowiedzi Th1 [2–4].

Chociaż — jak wiadomo — IFN γ pełni kluczową rolę w procesach obronnych w gruźlicy, to wiadomo też, iż oznaczenie jedynie poziomu IFN γ nie pozwala na wyjaśnienie dychotomii odporność — podatność. Wydaje się prawdopodobne, że efektywność odpowiedzi Th1 zależy od braku innych współistniejących czynników. Wśród tychże czynników mogą być pewne formy odpowiedzi Th2, gdyż IL-4 hamuje aktywność indukowanej syntazy tlenu azotu [6]. Jednakże rola tej cytokiny jest kontrowersyjna, gdyż obecnie wiemy, że składa się z dwóch postaci: IL-4 i jej antagonisty IL-4 Δ 2 [6].

Dheda udowodnił podwyższenie poziomu mRNA dla IL-4 i IL-4 Δ 2 w komórkach krwi i płynu oskrzelikowo-pęcherzykowego chorych na gruźlicę w odniesieniu do grupy kontrolnej. Czas półtrwania mRNA dla IL-4, lecz nie dla IL-4 Δ 2 był istotnie wydłużony u chorych na gruźlicę [7]. Demissie wskazał ponadto, iż zdrowe, zakażone prątkiem gruźlicy osoby wykazują selektywny wzrost IL-4 Δ 2 [5]. Wydaje się, iż długotrwała kontrola zakażenia *M. tuberculosis* współistnieje nie tylko ze wzmoczeniem odpowiedzi Th1, lecz także z zahamowaniem odpowiedzi Th2.

Odpowiedź Th2 przejawia się między innymi wzrostem poziomu przeciwciał przeciwprątkowych we krwi.

Przedmiotem badania było porównanie funkcji Th1 komórek obwodowych krwi oraz poziomu

przeciwciał przeciwprątkowych w surowicy chorych na gruźlicę oraz osób zdrowych pozostających z nimi w styczności.

Materiał i metody

Badaniem objęto 51 chorych na gruźlicę i 20 zdrowych pracowników Instytutu Gruźlicy pozostających w styczności z gruźlicą od co najmniej 5 lat.

Grupa chorych na gruźlicę składała się z 34 kobiet i 27 mężczyzn w wieku od 19 do 80 lat (średnia $45,2 \pm 20,2$). Grupę kontrolną stanowiło 15 kobiet i 5 mężczyzn w wieku od 29 do 69 lat (średnia $45,8 \pm 11,3$).

Rozpoznanie gruźlicy ustalano na podstawie: potwierdzonej dodatnim posiewem obecności prątków gruźlicy w płwocinie bądź popłuczynach oskrzelowych, obecności charakterystycznych dla gruźlicy objawów klinicznych oraz typowych zmian radiologicznych. Z badania wykluczono osoby podejrzewane o upośledzenia odporności, czyli te, u których gruźlica współistniała z: cukrzycą, nowotworem, zakażeniem HIV czy też niewydolnością nerek.

Produkcję cytokin przez jednojądrowe komórki krwi obwodowej (PBMC) badano w hodowli krwi pełnej, opierając się na metodzie opracowanej przez Elsässer-Beile i wsp. [8] i zastosowanej do badania chorych na gruźlicę przez Elliot i wsp. [9].

Od chorych na gruźlicę (przed włączeniem leczenia przeciwprątkowego) oraz zdrowych pobierano na czczo 5 ml krwi żyłnej do probówki z dodatkiem heparyny. Hodowlę pełnej krwi zakładano w ciągu dwóch godzin od chwili pobrania na standardowych podłożach hodowlanych RPMI 1640 (GIBCO) wzbogaconych w L-glutaminę, streptomycynę (50 μ g/ml) oraz penicylinę (50 μ g/ml).

Do stymulacji komórek użyto Phytolacca Americana (PWM-Sigma) w stężeniu 5 μ g/ml, PHA (Murex) w stężeniu 10 μ g/ml oraz tuberkulinę (RT Statens Serum Institute) w stężeniu 12,5 μ g/ml i 25 μ g/ml.

W każdej badanej próbce (6 ml Falcon 2058) znajdowało się 50 μ l krwi, mitogen rozpuszczony w 50 μ l RPMI 1640 lub 50 μ l RPMI bez mitogenu oraz 400 μ l podłoża RPMI.

Badanie wykonano w duplikatach, zatem dla każdego z badanych założono dwie hodowle z PWM, dwie z PHA oraz dwie bez mitogenu. Dodatkowo u 25 chorych na gruźlicę i 14 zdrowych przeprowadzono w dwóch powtórzeniach hodowlę z dodatkiem tuberkuliny w stężeniach 12,5 μ g/ml i 25 μ g/ml.

Hodowle prowadzono w temperaturze 37°C, atmosferze 5% CO₂ przy wilgotności 100%. Po 4 dniach inkubacji w celu analizy poziomu cytokin uzyskiwano supernatant. Poziom cytokin w supernatancie oznaczano za pomocą gotowych testów ELISA (R&D) dla IFN γ (zakres 0–1000 pq/ml, czułość 8 pq/ml) oraz IL-2 (zakres 0–2000 pq/ml, czułość 7 pq/ml). Po wykonaniu serii rozcieńczeń uznano, że w zakresie czułości testu dla IFN γ najlepiej mieści się rozcieńczenie 1:160, natomiast dla IL-2 — 1:10. Stężenie cytokin było proporcjonalne do natężenia reakcji barwnej odczytywanej spektrofotometrycznie za pomocą czytnika (ELX 800 BIO-TEK INSTRUMENTS INC) przy długości fali 450 nm. Uzyskane wyniki przeliczano za pomocą krzywej standardowej. Wynik końcowy prezentowano jako średnią arytmetyczną pomiarów uzyskanych w obu powtórzeniach.

W dniu założenia hodowli pobierano jednocześnie 2 ml krwi na EDTA, w celu analizy układu białokrwinkowego przy użyciu cytometru przepływowego (BD Biosciences FACScan) wraz z oprogramowaniem SimulSET wersja 3.1, a także poszukiwania przeciwciał przeciwpłatkowych.

Pobraną w celu analizy przeciwciał krew odwirowywano, a uzyskane surowice przechowywano w temperaturze –20°C do czasu wykonania oznaczeń. W badaniu zastosowano komercyjne testy immunoenzymatyczne: do wykrywania przeciwciał IgG przeciw antygenom 38 kDa i 16 kDa Pathozyme Tb complex plus (Omega Diagnostics Scotland) oraz przeciwciał IgG, IgA i IgM przeciw antygenowi 38 kDa i lipoarabinomannan (LAM) (Myc G, Myco A i Myco M, Omega Diagnostics Scotland).

LAM jest szeroko rozpowszechnionym antygenem prątków, a antygeny 38 kDa i 16 kDa są rekombinowanymi antygenami prątków, prezentowanymi i uzyskiwanymi z *E. coli*. Wszystkie oznaczenia oparto na teście podwójnego wiązania *sandwich* ELISA.

Rozcieńczone 1:50 bądź 1:100 (zgodnie z zaleceniami producenta) surowice nanoszono na opłaszczony opisany powyżej antygenami płyt-

ki. W każdej badanej surowicy oznaczenie wykonywano dwukrotnie. W przypadkach pozytywnych kompleks antygen-przeciwciała wiązał się ze znakowanym peroksydazą przeciwciałem pomostowym anty IgG (IgA lub IgM). Użycie H₂O₂/TMB jako substratu uruchamiało reakcję barwną, której natężenie mierzono za pomocą czytnika spektrofotometrycznego ELX 800 (Biotec) przy długości fali 450 nm.

Dostarczone próbki standardowe pozwoliły na generację quasi-logarytmicznej krzywej referencyjnej. Jako że surowice rozcieńczono 1:50 lub 1:100, jednostki ekstrapolowane z krzywej standardowej mnożono przez 50 (100), co pozwoliło na obliczenie miana przeciwciał w próbce. Wyniki oznaczeń IgM wyrażano jako stosunek gęstości optycznej (OD) próbki badanej do OD próbki wyznaczonej jako poziom odcięcia.

Statystyczną analizę uzyskanych wyników przeprowadzono z użyciem nieparametrycznego testu U Manna-Whitneya. Do określenia korelacji pomiędzy wynikami trzech zastosowanych metod wykorzystano test Spearmana. Badanie uzyskało akceptację Komisji Etycznej Instytutu Gruźlicy. Wszyscy uczestnicy wyrazili świadomą zgodę na udział w badaniu.

Wyniki

Wśród chorych na gruźlicę w odniesieniu do grupy zdrowych pozostających z nimi w styczności stwierdzono istotne podwyższenie liczby leukocytów, monocytów i neutrofilów, przy czym nie obserwowano istotnych różnic w liczebności limfocytów B i T, jak i TCD4 (tab. 1).

Nie obserwowano różnic w sekrecji IL-2 i IFN γ pod wpływem PWM i PHA przez komórki krwi pełnej badanych obu grup (tab. 2, 3).

Wydzielanie IFN γ pod wpływem tuberkuliny było istotnie wyższe u chorych na gruźlicę w porównaniu do grupy zdrowych (tab. 4).

W surowicy chorych na gruźlicę poziomy przeciwciał IgG i IgA anty 38 kDa + LAM były istotnie wyższe w odniesieniu do zdrowych pracowników (tab. 5).

Dodatkowo, u chorych na gruźlicę poziomy przeciwciał IgG anty 38 kDa + LAM korelowały ujemnie z sekrecją IFN γ pod wpływem stymulacji niespecyficznego (tab. 6).

Omówienie

W przeprowadzonym badaniu ocenialiśmy sekrecję cytokin pod wpływem stymulacji PHA, PWM i tuberkuliny w hodowli krwi pełnej.

Tabela 1. Subpopulacje leukocytarne krwi chorych na gruźlicę oraz osób zdrowych pozostających z nimi w styczności**Table 1. White blood cell counts among patients with tuberculosis and healthy contacts**

Populacje komórkowe krwi <i>White blood cells population</i>		Chorzy na gruźlicę <i>Patients with tuberculosis</i>	Zdrowi <i>Healthy contacts</i>	Wynik testu (p) [*] <i>P value*</i>
Liczba badanych/ <i>Sample</i>		31	20	
Leukocyty/ <i>Leukocytes</i>	Mediana/ <i>Median</i>	8740	5900	0,0013
	Średnia ± SD/ <i>Mean ± SD</i>	8526,48 ± 2497,63	6344,5 ± 1991,40	
Monocyty/ <i>Monocytes</i>	Mediana/ <i>Median</i>	543	418	0,0039
	Średnia ± SD/ <i>Mean ± SD</i>	575,1 ± 234,94	426,6 ± 146,24	
Neutrofile/ <i>Neutrophiles</i>	Mediana/ <i>Median</i>	5923	3236,5	0,0001
	Średnia ± SD/ <i>Mean ± SD</i>	5956,13 ± 2407,25	3656,7 ± 1517,36	
Limfocyty/ <i>Lymphocytes</i>	Mediana/ <i>Median</i>	1477	1979	0,0580
	Średnia ± SD/ <i>Mean ± SD</i>	1711,42 ± 711,18	1960,9 ± 555,22	
Limfocyty B/ <i>Lymphocytes B</i>	Mediana/ <i>Median</i>	135,5	165	0,0973
	Średnia ± SD/ <i>Mean ± SD</i>	168,97 ± 141,58	182 ± 79,30	
Limfocyty T/ <i>Lymphocytes T</i>	Mediana/ <i>Median</i>	1205	1468,5	0,0638
	Średnia ± SD/ <i>Mean ± SD</i>	1233,23 ± 559,73	1433,9 ± 419,88	
Limfocyty T CD4 <i>Lymphocytes T CD4</i>	Mediana/ <i>Median</i>	746	813,5	0,0516
	Średnia ± SD/ <i>Mean ± SD</i>	704,32 ± 335,86	871,2 ± 338,24	
Limfocyty T CD8 <i>Lymphocytes T CD8</i>	Mediana/ <i>Median</i>	463	521	0,1823
	Średnia ± SD/ <i>Mean ± SD</i>	496,77 ± 259,77	541,65 ± 201,56	
Limfocyty T CD4/CD8 <i>Lymphocytes T CD4/CD8</i>	Mediana/ <i>Median</i>	1,48	1,45	0,3182
	Średnia ± SD/ <i>Mean ± SD</i>	1,63 ± 0,77	1,82 ± 0,94	
Komórki NK/ <i>NK cells</i>	Mediana/ <i>Median</i>	280	300,5	0,3244
	Średnia ± SD/ <i>Mean ± SD</i>	319,47 ± 188,43	338,9 ± 156,66	

*Statystyczne badanie istotności różnic pomiędzy chorymi na gruźlicę a zdrowymi przeprowadzono przy użyciu testu U Manna-Whitneya. Różnicę uznano za istotną, jeśli wartość $p < 0,05$ /Differences between patients with tuberculosis and healthy contacts were analyzed using U Mann-Whitney test. Statistical significance was considered if the p value was less than 0,05

Tabela 2. Wydzielanie IFN γ przez komórki krwi pełnej pod wpływem stymulacji PWM i PHA wśród chorych na gruźlicę oraz zdrowych pozostających z nimi w styczności**Table 2. IFN γ production by whole blood cells from Tb patients and controls stimulated with PWM and PHA**

IFN γ [pq/ml]		Chorzy na gruźlicę <i>Patients with tuberculosis</i>	Zdrowi <i>Healthy contacts</i>	Wynik testu (p) [*] <i>P value*</i>
Liczba badanych/ <i>Sample</i>		51	20	
PWM	Mediana [pq/ml]/ <i>Median [pq/ml]</i>	33 985,9	43 027,6	0,1548
	Średnia ± SD/ <i>Mean ± SD</i>	77 354,8 ± 113 389,6	46 198,5 ± 19 992,2	
PHA	Mediana [pq/ml]/ <i>Median [pq/ml]</i>	41 010,0	36 571,0	0,1401
	Średnia ± SD/ <i>Mean ± SD</i>	86 831,7 ± 134 429,0	38 555,8 ± 23 681,5	

*Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu U Manna-Whitneya. Różnicę uznano za istotną, jeśli wartość $p < 0,05$ /Statistical analysis was performed with the use of Mann-Whitney U test. Statistical significance was accepted at the level of $p < 0,05$

Metodę hodowli krwi pełnej opracował Luquetti, a następnie potwierdziła Elsässer-Beile [8]. Porównała ona hodowlę krwi pełnej z hodowlą wyizolowanych komórek jednojądrowych, stwierdzając bezpośrednią korelację między obiema metodami w ocenie wydzielania cytokin.

W wykonanym badaniu stwierdziliśmy, iż wydzielanie IL-2 i IFN γ pod wpływem stymulacji

PWM i PHA u chorych na gruźlicę było porównywalne do tego w grupie osób zdrowych. Wyniki naszych obserwacji korelują z doświadczeniami Morosini oraz Castro-Cunha i wsp., którzy szacowali liczebność komórek wydzielających IFN γ [10, 11]. Z drugiej strony, Garcia oraz Toossi i wsp. stwierdzili, że pod wpływem stymulacji niespecyficznej dochodzi do spadku liczebności limfocytów

Tabela 3. Wydzielanie IL-2 przez komórki krwi pełnej pod wpływem stymulacji PWM i PHA wśród chorych na gruźlicę oraz zdrowych pozostających z nimi w styczności**Table 3. IL-2 production by whole blood cells from patients with tuberculosis and healthy controls stimulated with PWM and PHA**

L-2 [pg/ml]		Chorzy na gruźlicę <i>Patients with tuberculosis</i>	Zdrowi <i>Healthy contacts</i>	Wynik testu (p) [*] <i>P value</i> [*]
Liczba badanych/ <i>Sample</i>		51	20	
PWM	Mediana [pg/ml]/ <i>Median [pg/ml]</i>	337,5	431,5	0,3250
	Średnia ± SD/ <i>Mean ± SD</i>	617,2 ± 659,7	524,9 ± 425,9	
PHA	Mediana [pg/ml]/ <i>Median [pg/ml]</i>	631,2	827,9	0,4669
	Średnia ± SD/ <i>Mean ± SD</i>	1676,7 ± 2221,9	1181,6 ± 1068,8	

*Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu U Manna-Whitneya. Różnicę uznano za istotną, jeśli wartość $p < 0,05$ /*Statistical analysis was performed with the use of Mann-Whitney U test. Statistical significance was accepted at the level of $p < 0.05$*

Tabela 4. Wydzielanie IFN γ przez komórki krwi pełnej pod wpływem stymulacji tuberkuliną (RT 25 μ g/ml i 12,5 μ g/ml) wśród chorych na gruźlicę oraz zdrowych pozostających z nimi w styczności**Table 4. Secretion of IFN γ by whole blood cells from patients with tuberculosis and healthy contacts stimulated with PPD (RT25 μ g/ml and 12.5 μ g/ml)**

IFN γ [pg/ml]		Chorzy na gruźlicę <i>Patients with tuberculosis</i>	Zdrowi <i>Healthy contacts</i>	Wynik testu (p) [*] <i>P value</i> [*]
Liczba badanych/ <i>Sample</i>		25	14	
RT 25	Mediana [pg/ml]/ <i>Median [pg/ml]</i>	3670,81	1479,35	0,0141
	Średnia ± SD/ <i>Mean ± SD</i>	7289,54 ± 10 019,47	3154 ± 4794,88	
RT 12,5	Mediana [pg/ml]/ <i>Median [pg/ml]</i>	3141,98	774,94	0,0116
	Średnia ± SD/ <i>Mean ± SD</i>	7954,68 ± 15 856,46	5051,24 ± 11 846,58	

*Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu U Manna-Whitneya. Różnicę uznano za istotną, jeśli wartość $p < 0,05$ /*Statistical analysis was performed with the use of Mann-Whitney U test. Statistical significance was accepted at the level of $p < 0.05$*

Tabela 5. Stężenia przeciwciał przeciwprątkowych w surowicy chorych na gruźlicę oraz zdrowych pozostających z nimi w styczności**Table 5. Antimycobacterial antibody levels (Pathozyme-Plus and Pathozyme-Myco G, -Myco A and Myco M) in sera from patients with tuberculosis and healthy contacts**

Testy serologiczne <i>Serological tests</i>		Chorzy na gruźlicę <i>Patients with tuberculosis</i>	Zdrowi <i>Healthy contacts</i>	Wynik testu (p) [*] <i>P value</i> [*]
Liczba badanych/ <i>Sample</i>		50	20	
IgG anti 38 + 16 kDa ^b <i>IgG anti 38 + 16 kDa^b</i>	Mediana [pg/ml]/ <i>Median [pg/ml]</i>	171,6	147,2	0,2355
	Średnia ± SD/ <i>Mean ± SD</i>	349,0 ± 485,9	154,9 ± 80,4	
IgG anti 38 kDa + LAM ^b <i>IgG anti 38 kDa + LAM^b</i>	Mediana [pg/ml]/ <i>Median [pg/ml]</i>	253,9	45,4	0,0155
	Średnia ± SD/ <i>Mean ± SD</i>	387,5 ± 500,7	82,5 ± 139,0	
IgA anti 38 kDa + LAM ^b <i>IgA anti 38 kDa + LAM^b</i>	Mediana [pg/ml]/ <i>Median [pg/ml]</i>	365,6	152,7	< 0,0001
	Średnia ± SD/ <i>Mean ± SD</i>	936,6 ± 1792,9	187,8 ± 111,5	
IgM anti 38 kDa + LAM <i>IgM anti 38 kDa + LAM</i>	Mediana [pg/ml]/ <i>Median [pg/ml]</i>	0,65	0,74	0,4650
	Średnia ± SD/ <i>Mean ± SD</i>	0,83 ± 0,52	0,77 ± 0,38	

*Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu U Manna-Whitneya. Różnicę uznano za istotną, jeśli wartość $p < 0,05$ /*Statistical analysis was performed with the use of Mann-Whitney U test. Statistical significance was accepted at the level of $p < 0.05$*

^bPoziomy przeciwciał IgG i IgA wyrażono w U/ml. Poziom przeciwciał IgM wyrażono jako indeks gęstości optycznej/IgG and IgA antibody level was expressed in U/ml. IgM antibody level was expressed as optical density ratio

pozytywnych dla Th1 cytokin [3, 12]. Powodem rozbieżności wyników przedstawionych prac może być dobór chorych z różnymi postaciami gruźlicy.

W naszym materiale zmniejszone wydzielanie cytokin pod wpływem stymulacji niespecyficzej obserwowano w gruźlicy bardzo zaawansowanej [13].

Tabela 6. Korelacja stężeń przeciwciał przeciwprątkowych z wydzielaniem IL-2 i IFN γ przez stymulowane PWM i PHA komórki krwi pełnej wśród chorych na gruźlicę**Table 6. Correlation between antimycobacterial antibody level and PWM or PHA-induced production of IL-2 and IFN γ in blood from patients with tuberculosis**

Chorzy na gruźlicę <i>Patients with tuberculosis</i>	PWM/IL-2	PHA/IL-2	PWM/IFN γ	PHA/IFN γ
Liczba badanych/ <i>Sample</i>	50	50	50	50
IgG anty 38 + 16 kDa/IgG anti 38 + 16 kDa korelacja Spearmana/ <i>Spearman correlation</i> wynik testu (p) ^a / <i>P value</i> ^a	-0,1452 ns	-0,0964 ns	-0,0199 ns	-0,0268 ns
IgG anty 38 kDa + LAM/IgG anti 38 kDa + LAM korelacja Spearmana/ <i>Spearman correlation</i> wynik testu (p) ^a / <i>P value</i> ^a	-0,3358 *	-0,4462 ***	-0,4553 ***	-0,4707 ***
IgA anty 38 kDa + LAM/IgA anti 38 kDa + LAM korelacja Spearmana/ <i>Spearman correlation</i> wynik testu (p) ^a / <i>P value</i> ^a	-0,0593 ns	0,0022 ns	-0,0195 ns	-0,1114 ns
IgM anty 38 kDa + LAM/IgM anti 38 kDa + LAM korelacja Spearmana/ <i>Spearman correlation</i> wynik testu (p) ^a / <i>P value</i> ^a	-0,0037 ns	-0,1905 ns	-0,1053 ns	-0,1292 ns

^aWynik testu statystycznej istotności współczynnika korelacji Spearmana; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ns (*not significant*) — nieistotnie różne od zera
The results are calculated with the use of Spearman correlation test; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ns — not significant

W prezentowanej pracy sekrecja IFN γ pod wpływem stymulacji tuberkuliną była istotnie wyższa u chorych na gruźlicę w odniesieniu do zdrowych. Wyniki doświadczeń opisanych w literaturze dotyczących tego zagadnienia są sprzeczne. Wielu autorów stwierdziło, iż u chorych na gruźlicę pod wpływem stymulacji specyficznej dochodzi do osłabienia produkcji cytokin Th1 [3–5, 14–16]. Wyniki prac innych badaczy są odmienne. Długowitzy i wsp. stwierdzili wzrost produkcji IFN γ , TNF α i TGF β pod wpływem stymulacji zsonifikowaną postacią *Mycobacterium tuberculosis* u chorych na gruźlicę w porównaniu do grupy kontrolnej [17]. Fortes i wsp. zauważyli, że liczba limfocytów pozytywnych dla IFN γ pod wpływem stymulacji ESAT-6 była wyższa u chorych z gruźlicą lekowrażliwą w porównaniu ze zdrowymi oraz chorymi z gruźlicą lekooporną [18]. Podobne obserwacje w hodowlach stymulowanych tuberkuliną poczynili Ferrand, Ulrichs oraz Morosini i wsp. [10, 19, 20].

Wyniki wielu doświadczeń wskazują na wzrost roli cytokin Th2 w gruźlicy. Liczni autorzy stwierdzili wzrost poziomu IL-10 we krwi chorych na gruźlicę [2, 3, 5, 14, 15, 21]. Sanchez i wsp. obserwowali podwyższenie poziomu IL-4 pod wpływem stymulacji PPD wraz z wysokim poziomem przeciwciał przeciwprątkowych [16]. Seah i wsp., wykorzystując metodę odwrotnej transkrypcji polimerazowej reakcji łańcuchowej świeżo wyizolowanych komórek jednojądrowych krwi obwodowej, stwierdzili wzrost ekspresji IL-4 i IL-13 [22].

W naszym badaniu stwierdziliśmy wzrost poziomu przeciwciał przeciwprątkowych w surowicy chorych na gruźlicę w porównaniu z grupą zdrowych pozostających z nimi w styczności.

Ponadto zauważyliśmy, iż istnieje ujemna korelacja między poziomem przeciwciał przeciwprątkowych w surowicy a sekrecją IFN γ i IL-2 przez komórki krwi pełnej pod wpływem stymulacji niespecyficznej.

Wnioski

Wyniki naszej pracy są zgodne z wnioskami prac badawczych innych autorów i wskazują, iż nie tylko upośledzenie produkcji cytokin Th1, ale jednocześnie nadprodukcja cytokin Th2 są kluczowe dla rozwoju gruźlicy.

Piśmiennictwo

- Newport M.J., Nejentsev S. Genetics of susceptibility to tuberculosis in humans. *Monaldi Arch. Chest Dis.* 2004; 61: 102–111.
- Morosini M., Meloni F., Marone Bianco A. i wsp. The assessment of IFN-g and its regulatory cytokines in the plasma and bronchoalveolar lavage fluid of patients with active pulmonary tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2003; 7: 994–1000.
- Garcia M., Vargas J.A., Castejon R. i wsp. Flow-cytometric assessment of lymphocyte cytokine production in tuberculosis. *Tuberculosis* 2002; 82: 37–41.
- Jo E.K., Park J.K., Dockrell H.M. Dynamics of cytokine generation in patients with active pulmonary tuberculosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 2003; 16: 205–210.
- Demissie A., Abebe M., Aseffa A. i wsp. Healthy individuals that control a latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* express high levels of Th1 cytokines and the IL-4 antagonist IL-4A2. *J. Immunol.* 2004; 172: 6938–6943.
- Dheda K., Chang J.S., Breen R.A.M. i wsp. In vivo and in vitro studies of a novel cytokine interleukin 4A2, in pulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2005; 172: 501–508.

7. Dheda K., Chang J.S., Huggett J.F. i wsp. The stability of mRNA encoding IL-4 is increased in pulmonary tuberculosis, while stability of mRNA encoding the antagonistic splice variant, IL-4Δ2, is not. *Tuberculosis* 2007; 87: 237–241.
8. Elsässer-Beile U., Von Kleist S., Gallati H. Evaluation of a test system for measuring cytokine production in human whole blood cell cultures. *J. Immunol. Methods* 1991; 139: 191–195.
9. Elliot A.M., Hurst T.J., Balyeku M.N. i wsp. The immune response to *Mycobacterium tuberculosis* in HIV-infected and uninfected adults in Uganda: application of a whole blood cytokine assay in an epidemiological study. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 1999; 3: 239–247.
10. Morosini M., Meloni F., Uccelli M. i wsp. Ex vivo evaluation of PPD-specific IFN- γ or IL-5 secreting cells in the peripheral blood and lungs of patients with tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2005; 9: 753–759.
11. De Castro Cunha R.M., Kallas E.G., Rodrigues D.S. i wsp. Interferon- γ and tumor necrosis factor- α production by CD4⁺T and CD8⁺ T lymphocytes in AIDS patients with tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.* 2005; 140: 491–497.
12. Toossi Z., Kleinhenz M.E., Ellner J.J. Defective interleukin 2 production and responsiveness in human pulmonary tuberculosis. *J. Exp. Med.* 1986; 163: 1162–1172.
13. Winek J., Rowińska-Zakrzewska E., Demkow U. i wsp. Interferon gamma production in the course of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Physiol. Pharmacol.* 2008; 59 (supl. 6): 751–759.
14. Hirsch C.S., Toossi Z., Othieno C. i wsp. Depressed T-cell interferon- γ responses in pulmonary tuberculosis: analysis of underlying mechanisms and modulation with therapy. *J. Infect. Dis.* 1999; 180: 2069–2073.
15. Vankayalapati R., Wizek B., Weis S.E. i wsp. Serum cytokine concentrations do not parallel *Mycobacterium tuberculosis*-induced cytokine production in patients with tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.* 2003; 36: 24–28.
16. Sanchez F.O., Rodriguez J.I., Agudelo G., Garcia L.F. Immune responsiveness and lymphokine production in patients with tuberculosis and healthy controls. *Infect. Immun.* 1994; 62: 5673–5678.
17. Dlugovitzky D., Bay M.L., Rateni L. i wsp. Influence of disease severity on nitrite and cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with pulmonary tuberculosis (TB). *Clin. Exp. Immunol.* 2000; 122: 343–349.
18. Fortes A., Pereira K., Antas P.R.Z. i wsp. Detection of in vitro interferon- γ and serum tumour necrosis factor- α in multidrug-resistant tuberculosis patients. *Clin. Exp. Immunol.* 2005; 141: 541–548.
19. Ferrand R.A., Bothamley G.H., Whelen A., Dockrell H.M. Interferon-gamma responses to ESAT-6 in tuberculosis patients early into and after antituberculosis treatment. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2005; 9: 1034–1039.
20. Ulrichs T., Anding P., Kaufmann S.H.E., Munk M.E. Numbers of IFN γ -producing cells against ESAT-6 increase in tuberculosis patients during chemotherapy. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2000; 4: 1181–1183.
21. Verbon A., Juffermans N., Van Deventer S.J.H. i wsp. Serum concentrations of cytokine in patients with active tuberculosis (TB) and after treatment. *Clin. Exp. Immunol.* 1999; 115: 110–113.
22. Seah G.T., Scott G.M., Rook G.A.W. Type 2 cytokine gene activation and its relationship to extent of disease in patients with tuberculosis. *J. Infect. Dis.* 2000; 181: 385–389.