

## Продукция оксида азота мононуклеарами крови у больных лекарственно-чувствительным и лекарственно-устойчивым туберкулезом легких

*Стрелис А.К., Новицкий В.В., Уразова О.И., Земляная Н.А., Воронкова О.В., Филинюк О.В., Пирогова Н.П., Серебрякова В.А., Буйнова Л.Н., Есимова И.Е.*

## Production of nitric oxide by blood monocytes in patients with drug-sensitive and drug-resistance pulmonary tuberculosis

*Strelis A.K., Novitsky V.V., Ourazova O.I., Zemlyanaya N.A., Voronkova O.V., Filinyuk O.V., Pirogova N.P., Serebryakova V.A., Bouinova L.N., Yesimova I.E.*

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Стрелис А.К., Новицкий В.В., Уразова О.И. и др.

Изучена продукция оксида азота NO<sup>\*</sup> моноцитами периферической крови у 53 больных лекарственно-чувствительным и 50 пациентов с лекарственно-устойчивым туберкулезом легких (ТЛ) до, в процессе и после противотуберкулезной терапии. Уровень продукции NO<sup>\*</sup> определяли с помощью реактива Грисса. При лекарственно-чувствительном ТЛ установлено повышение секреции NO<sup>\*</sup> до начала терапии и после интенсивной фазы лечения и, напротив, ее угнетение после завершения полного курса противотуберкулезной терапии. У больных лекарственно-устойчивым ТЛ до и после проведения курса интенсивного лечения секреция NO<sup>\*</sup> моноцитами крови снижалась и увеличивалась после окончания полного курса терапии.

**Ключевые слова:** туберкулез легких, моноциты, оксид азота.

Nitric oxide NO<sup>\*</sup> production by blood monocytes was studied in 53 patients with drug-sensitive pulmonary tuberculosis (TB) and 50 patients with multidrug resistance (MDR) TB before and during the anti-tuberculosis therapy. Levels of NO<sup>\*</sup> production were determined using the Griess's reactant. Increased levels of NO<sup>\*</sup> secretion were observed before the treatment and after the intensive phase of therapy of drug-sensitive TB. However, it decreased after the full course of the anti-tuberculosis therapy. At the MDR TB the NO<sup>\*</sup> production by monocytes was reduced before and after the intensive phase of treatment and increased after the end of the full course of therapy.

**Key words:** pulmonary tuberculosis, monocytes, nitric oxide.

УДК 616.24-002.5:612.127.4

### Введение

Клиническая картина современного туберкулеза легких (ТЛ) характеризуется тенденцией к прогрессированию, быстрому развитию деструктивного компонента (каверн), лекарственной устойчивости возбудителя [7, 9]. На сегодняшний день повсеместно отмечен рост агрессивности *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) в отношении защитных факторов макроорганизма и приобретения возбудителем «зловещего качества» резистентности к основным противотуберкулезным препаратам. Причиной такого патоморфоза, вероятно, наряду с изменением биологических свойств возбудителя является уг-

нетение иммунологической реактивности организма человека.

Известно, что защиту макроорганизма при туберкулезе обеспечивают макрофаги и Т-клетки, взаимодействие которых формирует единый сложный механизм протекции. Основными участниками ответных реакций на любые изменения, происходящие в тканях организма при их инфицировании, являются фагоциты периферической крови, способные к быстрой мобилизации мощного арсенала бактерицидных факторов [4, 10].

Среди активно исследуемых в последние годы молекул-эффекторов неспецифической резистентности, направленных на уничтожение микробов, вирусов,

злокачественных клеток, является оксид азота NO<sup>•</sup>. Установлено, что фагоцитирующие клетки продуцируют NO<sup>•</sup> под действием фермента — индуцибельной NO-синтазы (iNOS) в результате окисления L-аргинина. Реакция NO<sup>•</sup> с кислородом сопровождается образованием стабильных конечных продуктов — нитрита и нитрата — косвенных маркеров концентрации NO<sup>•</sup> в организме. Нарботка iNOS происходит как под действием инфекционного агента, так и под влиянием таких медиаторов воспаления, как интерферон-γ (ИНФ-γ), фактор некроза опухоли-α (ФНО-α) и др. [13]. Оксид азота обладает микробицидным действием не только на вне-, но и на внутриклеточные патогены, действуя посредством образования высокореакционных форм, таких как пероксинитрит ONOO<sup>-</sup> или радикалы диоксида азота NO<sub>2</sub><sup>•</sup> [3, 11]. Немаловажна роль оксида азота и как модулятора иммунного ответа. Известно, что NO<sup>•</sup> регулирует процессы иммунного отклонения при дифференцировке Т-хелперов (Th), обеспечивая поляризацию иммунного ответа в направлении Th1 посредством индукции выработки интерлейкина-12 (ИЛ-12) моноцитами [11]. Вместе с тем гипергенерация NO<sup>•</sup> в макро- и микрофагах может обуславливать апоптоз и некроз как самих клеток-продуцентов NO<sup>•</sup>, так и окружающих клеток [1].

В литературе достаточно полно охарактеризованы изменения уровня секреции NO<sup>•</sup> в клетках крови при различных патологических состояниях, в том числе инфекционного генеза. В то же время сведения о содержании в клетках оксида азота при ТЛ единичны. Так, И.В. Потаповым было отмечено снижение клеточной продукции NO<sup>•</sup> при ТЛ, что, как полагает автор, является одним из ключевых факторов патогенеза туберкулезного процесса [5]. Данные, полученные в экспериментах Л.В. Сахно и соавт., напротив, указывают на то, что спонтанная и стимулированная генерация NO<sup>•</sup> в мононуклеарах крови при активном туберкулезе может становиться чрезмерной, индуцировать апоптоз иммунокомпетентных клеток и развитие специфической анергии [8].

Целью настоящей работы явилось изучение продукции NO<sup>•</sup> мононуклеарами периферической крови у больных лекарственно-чувствительным и лекарственно-устойчивым ТЛ до, в процессе и после противотуберкулезной терапии.

## Материал и методы исследования

Было обследовано 103 больных (72 мужчины и 31 женщина) в возрасте от 20 до 60 лет с активным распространенным (три и более сегмента легких) ТЛ: инфильтративным ( $n = 56$ ), диссеминированным ( $n = 23$ ), фиброзно-кавернозным ( $n = 14$ ) туберкулезом легких и казеозной пневмонией ( $n = 10$ ). Для всех больных было характерно наличие синдрома интоксикации, бактериовыделения и деструктивных изменений в легких. Данные о лекарственной чувствительности МВТ были получены при микробиологическом исследовании мокроты методом абсолютных концентраций на среде Левенштейна—Йенсена.

Пациенты были разделены на две группы. Первую группу составили 53 больных, у которых сохранялась чувствительность МВТ к противотуберкулезным препаратам. Вторая группа была сформирована из 50 больных, у которых отмечалась устойчивость МВТ минимум к трем препаратам — изониазиду, рифампицину, стрептомицину (множественная лекарственная устойчивость). Пациенты с лекарственно-чувствительным ТЛ получали терапию по первому режиму согласно приказу № 109 Минздрава РФ [6]. При диагностике лекарственно-устойчивого ТЛ назначалась индивидуальная схема лечения (по четвертому режиму) с учетом чувствительности МВТ к противотуберкулезным препаратам.

Исследование проводили в три этапа: до лечения, в конце интенсивной фазы и после курса поддерживающей противотуберкулезной терапии (после полного курса лечения).

Контрольная группа состояла из 25 здоровых мужчин и женщин аналогичного возраста.

Уровень продукции оксида азота определяли по концентрации нитритов в культуральных супернатантах мононуклеаров периферической крови с помощью реактива Грисса [12]. Для получения супернатантов выделенные на градиенте плотности (1,077 г/см<sup>3</sup>) мононуклеарные лейкоциты ресуспендировали в полной питательной среде, состоящей на 90% из RPMI-1640 и на 10% из инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки («Sigma», США), 0,3 мг/мл L-глутамин, 100 мкг/мл гентамицина, 2 ммоль/мл HEPES («Flow», Великобритания). Количество клеток в суспензии стандартизировали до  $2,5 \cdot 10^6$ /мл. Для стимуляции секреторных способностей мононуклеаров использовали липополисахарид *Escherichia coli* (ЛПС, 10 мкг/мл), очищен-

ный туберкулин (ППД, 500 ЕД), фитогемагглютинин (ФГА, 30 мкг/мл).

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью пакета программ Statistica 6.0 с использованием непараметрического *U*-критерия Манна—Уитни. Различия между выборками считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

В работе Г.О. Каминской и соавт. [2] было показано, что активному легочному туберкулезу сопутствует нарастание уровня  $\text{NO}^{\bullet}$  в лейкоцитах крови с наиболее выраженными его сдвигами в мононуклеарах. При сохраненной способности последних адекватно наращивать генерацию  $\text{NO}^{\bullet}$  при контакте с МВТ процесс излечения протекал благоприятно, тогда как при снижении этой способности лечение оказывалось менее эффективным.

Была предпринята попытка оценить продукцию оксида азота моноцитами периферической крови в зависимости от варианта туберкулезного процесса, т.е. наличия или отсутствия чувствительности МВТ к противотуберкулезным химиопрепаратам. Известно, что химиотерапия в настоящее время является основным компонентом лечения ТЛ и подразделяется на две фазы — интенсивную и поддерживающую [6]. Фаза интенсивной терапии направлена на ликвидацию клинических проявлений заболевания и максимальное воздействие на возбудителя. Фаза продолжения терапии ориентирована на подавление сохраняющейся микобактериальной популяции, инволюцию туберкулезного процесса, а также восстановление функциональных возможностей больного.

При исследовании контрольных образцов внимание привлек тот факт, что стимуляция бактериальными антигенами мононуклеаров крови у здоровых доноров не вызвала ожидаемого прироста генерации оксида азота. Чем это могло быть обусловлено? Возможным объяснением может служить малая внутриклеточная концентрация индуцибельной  $\text{NO}$ -синтазы. Исследователи отмечают, что при анализе экспрессии  $i\text{NOS}$  в клетках альвеолярного лаважа у больных туберкулезом в среднем 65% клеток взаимодействуют со специфическими антителами к индуцибельной  $\text{NO}$ -синтазе, тогда как в лаваже здоровых людей обнаруживается лишь 10% позитивных клеток [3]. Возможно и то, что у здоровых доноров стимуляция клеточных

культур могла индуцировать реактивацию антиоксидантной системы клеток с последующей дисмутацией супероксидных радикалов, необходимых для образования маркерного продукта  $\text{NO}^{\bullet}$ -нитритов.

Наряду с этим у больных лекарственно-чувствительным ТЛ и у пациентов с лекарственно-устойчивым вариантом туберкулезной инфекции до начала лечения спонтанная продукция  $\text{NO}^{\bullet}$  мононуклеарными фагоцитами крови оказалась в пределах нормы. Индуцированная ЛПС генерация  $\text{NO}^{\bullet}$  превышала контрольные значения в среднем в 2,7 раза в первой группе пациентов, а во второй группе, напротив, оказалась в 3 раза ниже нормы. ФГА (у больных ТЛ первой и второй групп) и специфический стимулятор клеток — МВТ-антиген туберкулин (ППД) (у пациентов с лекарственно-чувствительным ТЛ до лечения) не вызывали усиления клеточной продукции  $\text{NO}^{\bullet}$ . Однако у больных лекарственно-резистентным ТЛ до начала проведения противотуберкулезной терапии уровень секреции  $\text{NO}^{\bullet}$  при действии ППД (так же как и при ЛПС-стимуляции) был существенно ниже контрольных значений (таблица). Указанные изменения, вероятно, могут быть связаны как с нарушением рецептор-опосредованной внутриклеточной передачи активирующих сигналов, так и с функциональной инертностью лейкоцитов.

После завершения интенсивной фазы химиотерапии у пациентов первой группы уровень продукции  $\text{NO}^{\bullet}$  на базальном уровне возрастал в среднем в 3 раза. У больных лекарственно-устойчивым ТЛ уровень спонтанной выработки  $\text{NO}^{\bullet}$  мононуклеарами крови, напротив, оказался значительно ниже контрольных значений. Стимуляция клеток ФГА у пациентов обеих исследуемых групп по-прежнему не вызывала выраженного усиления  $\text{NO}$ -продукции в сравнении с базальным ее уровнем. В то же время уровень секреции  $\text{NO}^{\bullet}$  при ЛПС- и ППД-активации лейкоцитов у больных ТЛ в первой и второй группах на данном этапе исследования был существенно ниже нормы (таблица).

После проведения полного курса лечения спонтанная генерация  $\text{NO}^{\bullet}$  мононуклеарами периферической крови у больных лекарственно-чувствительным ТЛ снижалась, у пациентов второй группы — восстанавливалась до нормы. Стимуляция клеточных культур ФГА у больных ТЛ обеих исследуемых групп вновь (равно как и после курса интенсивной

терапии) не вызывала значимого (относительно спонтанной генерации) усиления выработки радикала. Концентрация нитритов в культуральных супернатантах мононуклеарных лейкоцитов периферической крови у здоровых доноров и у больных туберкулезом легких до и в динамике противотуберкулезной терапии ( $\bar{X} \pm m$ )

Продукция оксида азота, моль/мл	Здоровые доноры (n = 25)	Больные лекарственно-чувствительным ТЛ (первая группа, n = 53)			Больные лекарственно-устойчивым ТЛ (вторая группа, n = 50)			
		До лечения	После курса интенсивной химиотерапии	После курса поддерживающей химиотерапии	До лечения	После курса интенсивной химиотерапии	После курса поддерживающей химиотерапии	
Спонтанная	0,319 ± 0,027	0,278 ± 0,021	1,019 ± 0,256 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,01$	0,172 ± 0,022 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,01$ $p_3 < 0,01$	0,451 ± 0,132	0,084 ± 0,009 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,01$	0,553 ± 0,173 $p_3 < 0,05$	
Стимулированная	ФГА	0,118 ± 0,017	0,135 ± 0,026	0,879 ± 0,408 $p_2 < 0,05$	0,067 ± 0,006 $p_2 < 0,01$ $p_3 < 0,05$ $p_4 < 0,01$	0,143 ± 0,033	0,101 ± 0,006 $p_2 < 0,05$	0,565 ± 0,116 $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$
	ЛПС	0,263 ± 0,048	0,724 ± 0,169 $p_1 < 0,05$ $p_4 < 0,01$ $p_5 < 0,05$	0,128 ± 0,013 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,001$ $p_4 < 0,01$ $p_5 < 0,05$	0,135 ± 0,003 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,01$ $p_5 < 0,05$	0,089 ± 0,005 $p_1 < 0,01$ $p_4 < 0,05$ $p_5 < 0,01$	0,096 ± 0,005 $p_1 < 0,01$	0,091 ± 0,004 $p_1 < 0,01$ $p_4 < 0,05$ $p_5 < 0,05$
	ППД	0,141 ± 0,009 $p_5 < 0,01$	0,120 ± 0,020 $p_6 < 0,01$	0,077 ± 0,009 $p_1 < 0,01$ $p_4 < 0,05$ $p_5 < 0,01$	0,072 ± 0,008 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,01$ $p_4 < 0,05$	0,090 ± 0,014 $p_1 < 0,05$ $p_4 < 0,05$ $p_5 < 0,01$	0,074 ± 0,005 $p_1 < 0,01$	1,241 ± 0,214 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,01$

Примечание. ФГА — фитогемагглютинин; ЛПС — липополисахарид; ППД — очищенный туберкулин;  $p$  — уровень статистической значимости различий показателей у пациентов первой и второй групп;  $p_1$  — по сравнению с аналогичными показателями у здоровых доноров;  $p_2$  — у больных туберкулезом легких соответствующей группы исследования до лечения;  $p_3$  — у больных туберкулезом легких соответствующей группы исследования после интенсивного курса терапии;  $p_4$  — по сравнению с базальным уровнем продукции NO<sup>•</sup>;  $p_5$  — по сравнению с ФГА-стимулированным уровнем продукции NO<sup>•</sup>;  $p_6$  — по сравнению с ЛПС-стимулированным уровнем продукции NO<sup>•</sup>.

Уровень ЛПС-стимулированной секреции NO<sup>•</sup> (у больных чувствительным и резистентным к терапии ТЛ) и ППД-активированной продукции радикала (у больных первой группы) сохранялся ниже контрольных значений, в то время как у больных лекарственно-резистентным ТЛ уровень секреции NO<sup>•</sup> при действии туберкулина, напротив, резко повышался (более чем в 8 раз относительно нормы) (см. таблицу).

Очевидно, угнетение выработки NO<sup>•</sup> мононуклеарами периферической крови при ТЛ в процессе противотуберкулезной терапии (более выраженное у больных лекарственно-чувствительным ТЛ, нежели у больных с лекарственной резистентностью возбудителя) определяется уменьшением бактериальной нагрузки на организм либо истощением резервных возможностей иммунокомпетентных лейкоцитов вследствие длительного бактериального воздействия. Кроме того, нельзя исключать фактор токсического влияния на клетки крови противотуберкулезных препаратов, что также могло обуславливать падение их секреторной активности. Вместе с тем установленное увеличение

генерации NO<sup>•</sup> мононуклеарными лейкоцитами под действием специфического антигена у больных лекарственно-устойчивым ТЛ после завершения поддерживающей фазы противотуберкулезной терапии, вероятно, определяется функциональной предуготовленностью мононуклеаров к повышенной секреции бактерицидных факторов в связи с возможным сохранением у данной категории пациентов к окончанию курса терапии части микобактериальной популяции (возможно, в виде L-форм).

Огромный интерес представляет оценка зависимостей изменения генерации оксида азота у больных ТЛ с клиническими показателями, скоростью абацелирования и негитивации мокроты, эффективностью лечения и динамикой рентгенологической картины, что является предметом дальнейших исследований.

## Заключение

Таким образом, у больных ТЛ отмечаются существенные нарушения продукции оксида азота мононуклеарными лейкоцитами крови, наиболее выражен-

ные на фоне лечения. После проведения курса интенсивной противотуберкулезной терапии у больных лекарственно-устойчивым ТЛ отмечается еще более значимое (чем до лечения) угнетение NO<sup>•</sup>-продуцирующей функции мононуклеаров, при лекарственно-чувствительном варианте инфекции уровень спонтанной и ФГА-активированной NO<sup>•</sup>-генерации возрастает при одновременном снижении ЛПС- и ППД-стимулированной секреции NO<sup>•</sup>. После завершения поддерживающей фазы лечения у пациентов с лекарственно-чувствительным ТЛ показатели NO<sup>•</sup>-продукции при всех типах стимуляции оказываются сниженными, у больных с лекарственной резистентностью возбудителя уровень спонтанной секреции оксида азота нормализуется на фоне многократного увеличения активности ППД-стимулированного NO<sup>•</sup>-образования.

#### Литература

1. Каминская Г.О. Оксид азота, его биологическая роль и участие в патологии органов дыхания // Проблемы туберкулеза. 2004. № 6. С. 3—11.
2. Каминская Г.О., Абдулаев Р.Ю. Изменения уровней оксида азота в мононуклеарах и нейтрофилах крови у больных с разным течением туберкулеза легких // Проблемы туберкулеза. 2004. № 8. С. 41—44.
3. Краснов В.А., Зенков Н.К., Колтаков А.Р., Меньщикова Е.Б. Активированные кислородные метаболиты при туберкулезе // Проблемы туберкулеза. 2005. № 9. С. 9—17.
4. Маянский А.Н., Маянский Д.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. Новосибирск: Наука, 1989. 342 с.
5. Потапов И.В. Исследование нитроксидергических нарушений и их фармакологическая коррекция в клетках мононуклеарно-фагоцитирующей системы при туберкулезе легких: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Челябинск, 2002. 27 с.
6. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 109 от 21 марта 2003 г. «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации». М., 2003.
7. Саин Д.О., Цымбаларь Г.Л. Современная характеристика распространенных и остропрогрессирующих форм туберкулеза легких // Проблемы туберкулеза. 1999. № 1. С. 27—30.
8. Сахно Л.В., Хонина Н.А., Норкина О.В. и др. Участие оксида азота в развитии туберкулезной анергии у больных туберкулезом легких // Проблемы туберкулеза. 2001. № 8. С. 42—46.
9. Стрелис А.К., Янова Г.В., Петрова Л.Е. Остропрогрессирующий туберкулез — новая категория больных в практике современной фтизиатрии // Проблемы туберкулеза. 1999. № 2. С. 4—5.
10. Фрейдлин И.С. Ключевая позиция макрофагов в цитокиновой регуляторной сети // Иммунология. 1995. № 3. С. 17—23.
11. Blaese R.M., Muchmore A.V. The mononuclear phagocyte system: the heart of host defense // Mead. Johnson Symp. Perinat. Dev. Med. 1986. № 24. P. 13—15.
12. Green L.C., Wagner D.A., Glodowsky Z. Analysis of nitrate, nitrite and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids // Anal. Biochem. 1982. V. 126. № 13. P. 131—138.
13. Gordon S. The role of the macrophage in immune regulation // Res. Immunol. 1998. № 149. P. 685—688.

Поступила в редакцию 06.03.2006 г.