

Биолог. журн. Армении, 1-2 (56), 2004

УДК 616.24-002.5-078.33

ЕСТЕСТВЕННЫЕ КИЛЛЕРНЫЕ КЛЕТКИ ПРИ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ В СИСТЕМЕ *IN VITRO*

М.А. КАРАЛЯН, М.З. БАХШИЯН*, З.Р. ТЕР-ПОГОСЯН

*Противотуберкулезный диспансер МЗ РА, 378510, г. Абовян
Кафедра гистологии ЕрГМУ им. М. Гераци, 375025

Исследовались некоторые аспекты одного из звеньев естественной резистентности – естественных киллерных клеток (ЕКК) при туберкулезном процессе и под действием препаратов противотуберкулезной терапии.

Изучались количественные показатели ЕКК и их цитотоксическое действие (ЦТД). Показано иммуносупрессивное действие рифампицина при 16-часовой инкубации. Выявлено, что при 4-часовой инкубации рифампицин не оказывал супрессии ЦТД ЕКК у больных туберкулезом.

Изониазид обладал более слабым действием на изучаемые показатели – он лишь вызывал тенденцию к их снижению.

Ուսումնասիրվել են բնական ռեզիստենտականության օղակներից մեկի որոշ տեսակետները բնական քիլերային բջիջները տուբերկուլյոզային պրոցեսում և հակատուբերկուլյոզային քիմիոթերապիայի պատրաստուկների ազդեցության պայմաններում:

Հետազոտվել են բնական քիլերային բջիջների քանակական ցուցանիշները և նրանց ցիտոտոքսիկ ազդեցությունը: Ցույց է տրված ռիֆամպիցինի իմունոսուպրեսիվ ազդեցությունը 16-ժամյա ինկուբացիայի պայմաններում: Հայտնաբերվել է, որ 4-ժամյա ինկուբացիայի պայմաններում ռիֆամպիցինը չի ցուցաբերել սուպրեսիվ բնական քիլերային բջիջների ցիտոտոքսիկ ազդեցության վրա տուբերկուլյոզով հիվանդների մոտ:

Իզոնիազիդը հետազոտվող ցուցանիշների վրա ցուցաբերել է առավել թույլ ազդեցություն առաջացնելով միայն նրանց նվազելու միտում:

Natural resistance (particularly natural killer cells - NK) was investigated at tuberculosis process and under the action of different antituberculous preparations.

The quantitative parameters NK and their cytotoxic action. The were also investigated. The studies showed immunosuppressive action of rifampicin at the 16 h incubation. At the same time rifampicin did not render suppression of the cytotoxic action of NK at the patients by a tuberculosis at the 4 h incubation. There is no significant changes in action of the another preparation – isoniazid on the investigated characteristics, it only caused the tendency to their decrease.

Естественные клетки киллеры - цитотоксическое действие -макрофаги

Длительность течения и разнообразие клинических проявлений туберкулеза обуславливают необходимость поддержания иммунного гомеостаза больного с помощью иммунорегуляции, понимаемой нами как взаимодействие собственно иммунных реакций и факторов естественной резистентности. На сегодняшний день все больше внимания уделяется роли

иммунной системы при разных формах туберкулезного процесса. Настоящая работа является частью исследования особенностей естественного иммунного статуса у больных туберкулезом. Как известно, наиболее важными звеньями естественной резистентности организма являются естественные киллерные клетки (ЕКК) и макрофаги (МФ). Состояние иммунной системы важно и в связи с появлением сообщений об увеличении частоты лекарственной устойчивости различных форм микобактерий, когда роль иммунных реакций резко возрастает.

В настоящее время большое значение придается роли макрофагальной системы в развитии и прогрессировании туберкулезного процесса [3, 5, 9, 10, 15]. К сожалению, гораздо меньше внимания уделяется проблемам взаимодействия различных клеточных субпопуляций, в том числе и макрофагов при туберкулезном процессе [4, 9, 11, 13]. Практически не изучалось одно из основных звеньев естественного иммунитета - естественные киллерные клетки, принимающие участие во всех реакциях иммунной системы и являющиеся первым звеном резистентности организма [8].

В этом аспекте нами изучено влияние препаратов противотуберкулезной химиотерапии на количественные показатели и активность ЕКК *in vitro*.

В возросшем в последние годы интересе к противотуберкулезному иммунитету особое место занимает химиотерапия [2, 7]. В более ранних исследованиях изучался в основном иммунный контроль над терапией туберкулеза [10, 12], позже стали предприниматься попытки иммунотерапии [17]. В исследованиях по иммунологии туберкулеза преимущественно изучается естественный иммунитет, и в частности, система мононуклеарных фагоцитов, лишь единичные работы затрагивают проблемы взаимодействия лимфоцитов и макрофагов [11].

Как известно, ЕКК вместе с системой мононуклеарных фагоцитов осуществляют самый ранний этап противоопухолевой защиты. Их активность по отношению к инфекционным агентам менее изучена, однако способность осуществлять ими без предварительной иммунизации лизис практически всех чужеродных клеток позволяет считать это звено иммунитета чрезвычайно важным, особенно при первичном контакте с патогенными микроорганизмами.

Работа проведена нами в условиях *in vitro*. Целесообразность подобного исследования обеспечена данными литературы о корреляции между показателями *in vivo* и *in vitro*.

Материал и методика. Для определения количественных показателей клеток с ЕКК предлагается использовать методику, разработанную на основе биев - моноклональных антител (CD56+), насаженных на железные шарики (Dynabeads M-450, фирмы Dynal A. S. N-0212 Oslo Norway). Методика является современным способом определения количественных показателей различных клеточных субпопуляций [6]. С этой целью была исследована периферическая кровь у больных с диагнозом инфильтративного туберкулеза до начала противотуберкулезной химиотерапии (n=37). В качестве контроля использовали кровь клинически здоровых доноров (n=29).

Также нами было изучено действие рифампицина и изониазида на цитотоксическое действие (ЦТД) ЕКК [4, 7]. Использовали кровь больных до начала противотуберкулезной химиотерапии. С этой целью из крови больных с диагнозом инфильтративного туберкулеза

(n = 43) выделяли мононуклеары по методу Воуит [16]. ЦТД ЕКК определяли по методу Гордиенко [1]. В качестве контроля использовали кровь клинически здоровых доноров (n = 29). ЦТД ЕКК изучали при инкубации ЕКК с исследуемыми препаратами в течение 4 и 16 ч в атмосфере CO₂.

Оба изучаемых препарата использовали в терапевтических дозах – 0.01мг/мл.

Результаты и обсуждение. Данные о действии двух препаратов на ЦТД ЕКК при 4-часовой инкубации каждого из обоих препаратов приведены в табл. 1.

Таблица 1. Влияние рифампицина и изониазида на активность ЕКК при 4-часовой инкубации

Группы	n	Активность ЕКК, %		
		контроль	изониазид	рифампицин
Доноры	29	37.4±3.1	33.4±2.9	28.9±2.2*
Больные	43	36.9±3.7	34.8±3.0	30.3±3.5

Примечание: * достоверно (p<0.05) по сравнению с контролем

Согласно полученным результатам, наблюдалась тенденция к снижению ЦТД ЕКК при воздействии изониазида и достоверное снижение активности ЕКК при воздействии рифампицина, по сравнению с контролем. У больных инфильтративным туберкулезом наблюдалась лишь тенденция к снижению ЦТД ЕКК.

Таким образом, изониазид в терапевтических дозах не оказывает существенного иммуносупрессирующего действия на ЕКК, как у больных с диагнозом инфильтративного туберкулеза, так и у доноров. Рифампицин в дозе 0.01 мг/мл вызывает достоверное снижение ЦТД ЕКК у доноров.

После этого были проведены исследования с 16-часовой инкубацией препаратов (табл. 2).

Таблица 2. Влияние рифампицина и изониазида на активность ЕКК при 16-часовой инкубации

Группы	n	Активность ЕКК, %		
		контроль	изонназид	рифампицин
Доноры	29	42.1±4.8	35.7±3.9	30.4±2.9*
Больные	43	44.5±6.2	36.3±4.1	31.7±3.0*

Примечание: * достоверно (p<0.05) по сравнению с контролем

Как видно из таблицы, при 16-часовой инкубации ЕКК с исследуемыми препаратами отмечено достоверное снижение ЦТД не только у доноров, но, в отличие от 4-часовой инкубации, и у больных инфильтративным туберкулезом.

Затем нами были исследованы численные показатели клеток с рецептором CD56+, который, как известно, является одним из основных рецепторов среди клеток с естественной киллерной активностью [16].

Как видно из табл. 3, оба исследуемых препарата не оказывают выраженного иммуносупрессивного действия на количество CD56+ клеток. Однако у доноров, в целом имеющих несколько более высокие цифры количества CD56+ клеток, наблюдается тенденция к снижению изучаемого показателя как при инкубации с изониазидом, так и с рифампицином.

Таблица 3. Влияние рифампицина и изониазида на количество CD56+ клеток

Группы	n	Количество CD56+клеток, тыс/мл		
		контроль	изониазид	рифампицин
Доноры	29	58.1±7.97	50.9±8.41	49.3±7.26
Больные	37	50.6±13.3	48.5±12.1	49.7±11.2

Таким образом, нами изучено действие двух важных препаратов противотуберкулезной химиотерапии на показатели одного из звеньев естественного иммунитета. Показано общее иммуносупрессивное действие препаратов, проявляющееся в достоверном снижении ЦТД ЕКК у доноров при инкубации эффекторных клеток с рифампицином в течение 4 часов и достоверном снижении ЦТД ЕКК и у больных, и у доноров при 16-часовой инкубации в условиях *in vitro* (рис. 1). Выявлено также, что изониазид не оказывает столь выраженного действия на активность ЕКК и вызывает лишь тенденцию к снижению ЦТД даже при 16-часовой инкубации (рис. 2).

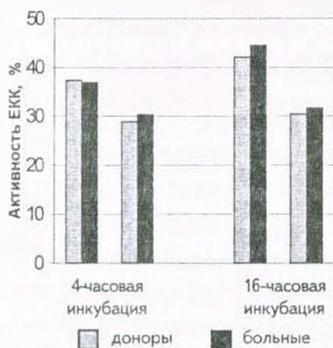


Рис. 1. Влияние рифампицина на ЦТД ЕКК при 4 и 16-часовой инкубации

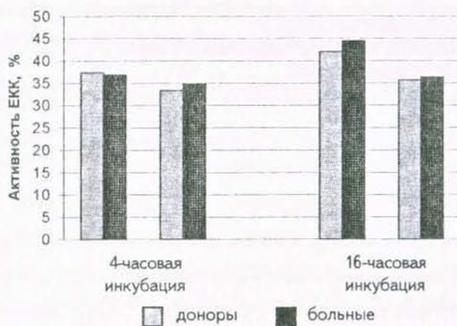


Рис. 2. Влияние изониазида на ЦТД ЕКК при 4 и 16-часовой инкубации

При изучении количественных показателей CD56+ клеток установлено отсутствие достоверных изменений при воздействии обоих препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гордиенко С.М. Лабораторное дело, 9, 45-48, 1983.
2. Грачева М.П. Проблемы туберкулеза, 3, 60-64, 1980.
3. Грачева М.П., Наровлянская С.Е., Горбачевская Л.В., Селицкая Р.П. Проблемы туберкулеза, 2, 52-56, 1988.
4. Ерохин В.В., Гедымин Л.Е. Проблемы туберкулеза, 5-6, 37-41, 1992.

5. Илькович М.М., Довнар Т.Е., Кинго З.Н., Пальмарчук Г.Ф. Проблемы туберкулеза, 9, 60-64, 1984.
6. Лимфоциты (Сб., методы), Новосибирск, 1990.
7. Ломакин М.С. Иммунобиологической надзор, 1990.
8. Малыгин А.А. Цитология, 5, 5-11, 1985.
9. Селедцова Г.В., Козлов В.А. Проблемы туберкулеза, 5, 54-56, 1991.
10. Сибирная Р.И. Проблемы туберкулеза, 9, 69-71, 1980.
11. Сокуренок Л.С., Морозов В.Л., Адамбеков Д.А., Ешеналиев М.К. Здравоохранение Киргизии, 2, 14-17, 1989.
12. Чернушенко Е.Ф., Шатров В.А., Беляновская Т.И., Кузнецова Л.В., Шпак О.И. Проблемы туберкулеза, 1, 59-63, 1986.
13. Шатров В.А., Кузнецова Л.В., Беляновская Т.И. Журн. микробиологии эпидемиологии и иммунологии. 5, 76-78, 1985.
14. Aharona Glatman-Freedman, Arturo Casadevall Clinical Microbiology Reviews, 11, 3, 514-532, July 1998,.
15. Barnes P.F., Modlin R.L. Curr.Top.Microbiol.Immunol, 197-219, 1996.
16. Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Scand. J. Clin. Lab. Invest, 61, 4, 629-634, 1968.
17. Condos R., Rom W., Schluger N. Lancet, 5, 24, 349 (9064), 1513-1515, 1997.

Поступила 12.XII.2003