

Л.И.Мордовская, В.А.Аксенова, Т.Н.Арефьева, А.Н. Мац,
М.А.Владимирский

ПРИМЕНЕНИЕ АФФИНОЛЕЙКИНА В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ТУБЕРКУЛЕ- ЗА ЛЕГКИХ У ПОДРОСТКОВ

УДК 616.24-002.5-053:616.24-002.5-078

Исследована клиническая и иммунокорригирующая эффективность иммунотерапевтического препарата аффинолейкина (АФЛ) в комплексном лечении туберкулеза легких у подростков. При иммунологическом исследовании у пациентов, получавших АФЛ, установлено увеличение уровня специфической антиген-индуцированной продукции интерферона-гамма (ИФН-γ) в образцах цельной крови *in vitro*; при иммунофенотипировании – увеличение процента циркулирующих гамма-дельта Т-лимфоцитов и уменьшение доли субпопуляции ИФН-γ-продуцирующих гамма-дельта Т-лимфоцитов, в том числе антиген-индуцированных *in vitro*. Предполагается, что АФЛ увеличивает миграцию эффекторных гамма-дельта клеток в очаги туберкулезного воспаления.

Ключевые слова: подростки, туберкулез легких, лечение, аффинолейкин, интерферон-гамма, гамма-дельта Т-лимфоциты, специфический противотуберкулезный иммунитет.

The clinical and immunocorrective efficacy of the immunotherapeutic drug Affinoleukin (AFL) in the complex treatment of pulmonary tuberculosis in adolescents is investigated. At the immunological study in patients treated with AFL a specific increase in antigen-induced production of interferon-gamma (IFN-γ) in samples of whole blood *in vitro* was determined; at the immunophenotyping – increase in the percentage of circulating gamma-delta T-lymphocytes and a decrease in the subpopulation proportion of IFN-γ - producing gamma-delta T-lymphocytes, including antigen-induced ones *in vitro* was noted. It is assumed that AFL increases the migration of effector gamma-delta cells in the foci of tuberculosis inflammation.

Keywords: adolescents, pulmonary tuberculosis, treatment, Affinoleukin, interferon-gamma, gamma-delta T-lymphocytes, a specific anti-tuberculosis immunity.

Подростковый возраст является одной из весьма уязвимых категорий в силу большого напряжения и гормональных, и психоэмоциональных факторов, оказывающих значительное влияние на эффективность клеточного иммунного ответа на туберкулезную инфекцию. В связи с этим изучение возможностей иммунопотенцирующих или иммунорегулирующих препаратов представляется достаточно актуальным направлением в комплексном лечении туберкулеза. Однако выбор эффективного препарата для лечения туберкулеза из большого спектра различных иммуномодулирующих препаратов требует серьезного анализа его влияния на иммунную систему пациентов с учетом современных представлений о механизмах специфической иммунной защиты при туберкулезной инфекции.

Аффинолейкин (АФЛ) – это иммунотерапевтический препарат, разработанный в НИИ вакцин и сывороток им.

И.И.Мечникова РАМН и выпускаемый филиалом ФГУП НПО «Микроген» МЗ и СР РФ пермским НПО «Биомед», обладающий активностью в переносе ГЗТ к туберкулину ППД, представляет собой комплекс низкомолекулярных белков (5 - 8 кДа), экстрагированных и очищенных по оригинальной технологии из лейкоцитарных мембран человека. Действующее начало препарата – низкомолекулярные антиген-специфичные цитокины Т-клеточного происхождения, точнее субъединицы растворимых антигенсвязывающих Т-клеточных молекул (ранее названные молекулами “трансфер-фактора”). Номинальная единица активности «трансфер-факторного препарата» – активность, эквивалентная не менее полмиллиарду лимфоцитов донорской крови. АФЛ относится к группе биофармацевтических препаратов, выпускаемых за рубежом под коммерческими названиями LeukoNorm (Германия), Immodin (Чехия), Hebertrans (Куба), Imunor (Словакия), Immunepotent CRP (Мексика) и Transfer factor (КНР). Эти препараты используются для иммунотерапии разнообразных форм недостаточности противомикробного и противоопухолевого клеточного иммунитета, в частности для лечения хронических и персистентных вирусных, бактериальных, грибковых инфекций и паразитарных инвазий [2, 4].

Цель исследования – изучение клинико-иммунологической эффективности аффинолейкина при лечении туберкулеза легких у подростков.

Материалы и методы. Обследовано 46 больных туберкулезом подрост-

ков в возрасте 14-17 лет, из них с впервые выявленным инфильтративным туберкулезом легких 42 чел., с диссеминированным туберкулезом легких – 2 чел., с казеозной пневмонией и первичным туберкулезным комплексом – по 1. Контакт с больным туберкулезом выявлен у 18 (39,1%) подростков, из них у 15 (83,3%) был внутрисемейный контакт. В клинической картине у них преобладали симптомы умеренной и выраженной интоксикации (слабость, адинамия, субфебрильная или фебрильная температура тела, потливость, плохой аппетит, дефицит массы тела) и бронхолегочные проявления (кашель с выделением слизистой или слизисто-гнойной мокроты, притупление легочного звука, жесткое или ослабленное дыхание, сухие, чаще разнокалиберные влажные хрипы). В анализах крови выявлена лимфопения, лейкоцитоз, сдвиг формулы влево, повышение СОЭ (до 45 мм/ч). Изучение чувствительности к туберкулину по пробе Манту с 2 ТЕ ППД-Л показало, что для подавляющего большинства подростков (39,1%) характерна умеренная чувствительность, в 26,1% случаев – слабо выраженная, 19,6 – выраженная, 6,5 – отрицательная, 2,2 – сомнительная и в 6,5% случаев встречается гиперергическая чувствительность к туберкулину. При рентгеномографическом обследовании установили, что ограниченный по протяженности туберкулезный процесс был у 25 (54,3%), распространенные специфические изменения в легких (2 сегмента и более) – у 21 (45,7%) пациента. У большинства подростков име-

МОРДОВСКАЯ Лариса Ивановна – к.м.н., с.н.с. ГУ НПЦ «Фтизиатрия» МЗ РС (Я), limordovskaya@mail.ru; **АКСЕНОВА Валентина Александровна** – д.м.н., проф., гл. внештат. фтизиопедиатр РФ, руковод. лаб. НИИ фтизиопульмонологии ММА им. И.М. Сеченова (Москва); **АРЕФЬЕВА Татьяна Николаевна** – с.н.с., Российск. кардиологич. науч.-производств. центр РАМН (Москва); **МАЦ Александр Наумович** – д.м.н., проф. ГУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН; **ВЛАДИМИРСКИЙ Михаил Александрович** – д.м.н., проф., руковод. лаб. НИИ фтизиопульмонологии ММА им. И.М. Сеченова, mvladimirskij@mail.ru.

лись деструктивные изменения. Микобактерии туберкулеза выделяли 26 больных, из них лекарственно-устойчивые штаммы выявлены у 9 (34,6%), в том числе с МЛУ – у 8 (88,9%).

Методом случайной выборки были сформированы две (контрольная и основная) группы по 23 пациента, в основном с инфильтративным туберкулезом легких (по 21 случаю). Наличие деструкции и бактериовыделения в контрольной группе – у 14 (60,9%), в опытной – у 16 (69,6%) и 12 (52,2%) больных соответственно.

Больным основной группы начиная со второго месяца интенсивного лечения наряду с антибактериальным лечением проводили иммунотерапию аффинолейкином. Пациенты контрольной группы получали только специфическую противотуберкулезную химиотерапию. Всем больным проводили противотуберкулезную терапию по стандартным схемам, установленным приказом №109 Минздрава России, до определения лекарственной чувствительности МБТ, далее лечение продолжали в соответствии с полученными результатами.

Аффинолейкин вводили подкожно один раз в день по 2 ед (растворяли в 1 мл физраствора содержимое 1 ампулы) 3 раза в неделю через день, всего 10 инъекций. У пациентов основной группы было получено информированное согласие. Исследование было одобрено Межвузовским комитетом по этике при ассоциации медицинских и фармацевтических вузов.

Изучали уровень антиген-специфической индукции в образцах цельной крови с гепарином (20 ед/мл), инкубированных по 1 мл в герметичных криопробирках объемом 5 мл в течение 22-24 ч при 370С. В опытные пробирки вносили антигены МБТ - туберкулин PPD и рекомбинантный антиген ESAT-6 в дозе 10 мкг/мл. В инкубированных образцах анализировали концентрацию интерферона-гамма (ИФН-γ) в надосадочной плазме с помощью количественного иммуноферментного анализа с использованием тест-системы, разработанной ранее [1]. Исследование антигенспецифической индукции ИФН-γ проводили в опытной и контрольной группах (в соответствующий период времени) до начала применения аффинолейкина и затем не ранее, чем через две недели после окончания курса.

Иммунологическое исследование включало в себя также определение субпопуляционного состава Т-лимфоцитов периферической крови после

краткосрочной инкубации с антигенами МБТ. Изучали общее содержание Т-лимфоцитов (CD3+), интерферон-гамма-продуцирующих Т-лимфоцитов (CD3+ ИФН-γ+), субпопуляции гамма-дельта Т-лимфоцитов (CD3+γδ+) и ИФН-γ продуцирующих гамма-дельта Т-лимфоцитов (CD3+CDγδ+ИФН-γ+). Иммунофенотипирование проводили методом проточной цитоиммунофлуоресценции (цитометр "FACSCalibur" фирмы "Becton Dickinson") с использованием соответствующих моноклональных антител фирмы "Becton Dickinson".

Результаты и обсуждение. По данным клинических наблюдений, включение в комплексную противотуберкулезную терапию у подростков аффинолейкина способствовало более быстрому уменьшению симптомов интоксикации. В основной группе достигнуто повышение относительного количества лимфоцитов с $32,4 \pm 1,6\%$ до $37,6 \pm 1,4\%$ ($p < 0,05$) после курса лечения аффинолейкином, в контрольной группе выявлена тенденция к повышению. Темпы прекращения бактериовыделения на фоне использования аффинолейкина опережали таковые в контрольной группе. Сроки прекращения бактериовыделения составили в основной группе – $1,9 \pm 0,4$ месяца, в контрольной группе – $2,39 \pm 0,35$ месяца. По результатам лечения в основной группе отмечалось более ускоренное рассасывание инфильтративных очагов, в среднем: $2,7 \pm 0,2$ месяца против $3,4 \pm 0,3$ месяца в контрольной группе. Средний срок закрытия полостей распада составил в основной группе $5,6 \pm 0,5$ месяца, в контрольной группе – $5,8 \pm 0,8$ месяца. В контрольной группе 6 подросткам было проведено оперативное лечение.

Процентные уровни Т-лимфоцитов периферической крови (CD3+) в контрольной и основной группах до включения в терапию аффинолейкина ($68 \pm 1,4$ и $67,3 \pm 4,1$, соответственно) и после ее проведения ($71,7 \pm 1,3$ и

$71,4 \pm 2,9$, соответственно) не отличались. Согласно данным табл.1, продукция ИФН-γ клетками крови в образцах, инкубированных с антигенами МБТ, значимо возрастала в группе аффинолейкина. Ранее мы установили [1, 3], что уровень специфической индукции ИФН-γ в образцах крови в присутствии туберкулина ППД или ESAT-6 у подростков, больных локальными формами туберкулеза легких, значительно ниже, чем в образцах крови пациентов с первичной туберкулезной инфекцией. Уровень индукции ИФН-γ в образцах крови больных туберкулезом в присутствии антигенов МБТ находится в обратной зависимости от распространенности и тяжести туберкулезного процесса. Восстановление этого показателя в процессе лечения коррелирует с положительной клинической динамикой [3].

В отличие от уровня количественной продукции ИФН-γ клетками крови процент Т-клеток экспрессирующих (продуцирующих) ИФН-γ (CD3+ИФН-γ+) в группе пациентов, получавших аффинолейкин, не отличался от контрольной группы.

В табл.2 представлены результаты определения доли субпопуляции гамма-дельта Т-клеток в основной и контрольной группах до и после курса аффинолейкина, а также процентной доли гамма-дельта Т-клеток, экспрессирующих ИФН-γ от общего числа гамма-дельта Т-клеток. Как видно, доля субпопуляции гамма-дельта Т-лимфо-

Таблица 1

Антигенспецифическая индукция ИФН-γ в образцах крови при адъювантной терапии аффинолейкином (АФЛ) у больных туберкулезом легких подростков

Группа	Концентрация ИФН-γ в образцах плазмы после инкубации с антигенами, пг/мл			
	антиген	до АФЛ	после АФЛ	p
Основная	PPD	$106,7 \pm 25,1$	$272,7 \pm 53,2$	$<0,05$
	ESAT-6	$43,9 \pm 10$	$155 \pm 42,9$	$<0,01$
Контрольная	PPD	$183,7 \pm 34$	$223,8 \pm 40,5$	$>0,05$
	ESAT-6	$88,6 \pm 22,7$	152 ± 33	$>0,05$

Таблица 2

Процент гамма-дельта Т-лимфоцитов (CD3+γδ+) и процент ИФН-γ (CD3+γδ+ИФН-γ+) продуцирующих гамма-дельта Т-клеток при применении аффинолейкина (АФЛ)

Группа	Субпопуляции	До АФЛ, %	После АФЛ, %	p
Основная	CD3+γδ+	$2,56 \pm 0,37$	$4,0 \pm 0,65^*$	$<0,05$
	CD3+γδ+ ИФН-γ+	$5,32 \pm 1,7$	$1,23 \pm 0,4^*$	$<0,05$
Контрольная	CD3+γδ+	$2,58 \pm 0,44$	$2,27 \pm 0,29$	$>0,05$
	CD3+γδ+ИФН-γ+	$3,6 \pm 0,9$	$3,22 \pm 1,0$	$>0,05$

* Данные достоверны по отношению к показателям контрольной группы.

цитов после проведения курса аффинолейкина достоверно увеличилась, тогда как доля гамма-дельта Т-клеток, экспрессирующих ИФН- γ , значительно уменьшилась. Эти изменения были отмечены только у пациентов основной группы.

Число гамма-дельта Т-клеток, экспрессирующих ИФН- γ после краткосрочной инкубации с антигенами PPD и ESAT-6 увеличивалось по сравнению с контролем без антигенов у всех пациентов. У пациентов основной группы, получавших аффинолейкин, после завершения его курса отмечено значимое уменьшение доли гамма-дельта Т-клеток, способных к индукции ИФН- γ антигенами PPD и ESAT-6. В контрольной группе эти изменения были незначительными.

Роль небольшой субпопуляции гамма-дельта Т-лимфоцитов в инфекционном процессе активно изучается в последние годы [8, 10]. Циркулирующие с кровью и инфильтрирующие лёгочные ткани гамма-дельта Т-лимфоциты при туберкулезной инфекции представляют собой один из компонентов, возможно, главный на ранней её стадии, клеточной антимикобактериальной врождённой и приобретённой резистентности [9]. Их активирует, вызывая пролиферацию и экспансию, широкий спектр белковых и небелковых (пиррофосфомоноэфир) антигенов микобактерий напрямую без участия молекул главного комплекса гистосовместимости и, что существенно, они – продуценты интерферона – гамма и фактора некроза опухолей альфа, обладают микобактериоцидностью, и при их участии формируются гранулёмы [6, 12]. Раннее повышение числа гамма-дельта Т-клеток в периферической крови (до 20% от CD3+Т-лимфоцитов) как компенсация отсутствия врождённой резистентности к МБТ с прогрессированием туберкулёзного процесса сменяется гамма-дельта Т-лимфопенией [7, 9].

По нашим данным, у здоровых, но инфицированных МБТ подростков относительное содержание гамма-дельта Т-лимфоцитов в крови составляло $4,93 \pm 0,81\%$, тогда как у больных

туберкулезом легких – $2,53 \pm 0,27\%$. То есть наблюдалось достоверное увеличение числа гамма-дельта Т-клеток в группе аффинолейкина, которое можно назвать восстановлением гомеостаза этих клеток. Относительное содержание в крови гамма-дельта Т-лимфоцитов, экспрессирующих ИФН- γ (CD3+ $\gamma\delta$ +IFN- γ +), как процент от общего числа CD3+ $\gamma\delta$ + клеток в группе аффинолейкина, наоборот, уменьшилось по сравнению с исходным уровнем, хотя в сравниваемые сроки не было различий между основной группой и группой сравнения. Уровень синтеза ИФН- γ гамма-дельта Т-клеткам (CD3+ $\gamma\delta$ +IFN- γ +), индуцированный специфическими антигенами МБТ (PPD и ESAT-6) также значительно уменьшался у пациентов в группе аффинолейкина. При туберкулезном инфицировании увеличивается приток гамма-дельта Т-клеток из костного мозга в кровоток. Однако при развитии активной туберкулезной инфекции число гамма-дельта Т-лимфоцитов в периферической крови уменьшается, что связывается с их миграцией в зоны специфического воспаления, в том числе в легкие, где они осуществляют свою эффекторную антимикробную и противовирусную функцию [6, 8, 10]. Можно предполагать, что применение аффинолейкина увеличивает число специфических эффекторных гамма-дельта Т-клеток, мигрирующих в очаги туберкулезного воспаления.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о возможности эффективной иммунокоррекции при включении иммунотерапевтического препарата аффинолейкина в комплексное лечение подростков с туберкулезом легких. Иммунокорректирующий эффект использования АФЛ проявляется в виде значимого повышения уровня антиген-индуцированной продукции интерферона- γ и увеличения доли гамма-дельта Т-лимфоцитов в периферической крови. В то же время применение АФЛ приводило к уменьшению числа антиген стимулированных ИФН- γ продуцирующих гамма-дельта Т-клеток в периферической крови, что подтверждает предположение об уси-

лении их эффекторной антимикробной функции в результате миграции в очаги туберкулезной инфекции. Хорошая переносимость лечения и отсутствие побочных реакций делают метод доступным для широкого использования во фтизиатрической практике.

Литература

1. Значение антиген-индуцированной продукции интерферона- γ in vitro при лечении туберкулеза легких у подростков / Л.И.Мордовская [и др.] // Иммунология. - 2009. - Т. 30, №4. - С.220 – 223.
2. Иммунотерапевтическая эффективность аффинолейкина при atopическом дерматите / Е.В. Задионченко [и др.] // Биопрепараты. - 2004. - № 4 (16). - С. 25 – 31.
3. Индукция интерферона-гамма в образцах цельной крови in vitro – тест для определения туберкулезного инфицирования детей и подростков / Л.И.Мордовская [и др.] // Проблемы туберкулеза и болезней легких. - 2009. - №6. - С.19-24.
- 4.Мац А.Н. Природа «Трансфер-факторной» активности иммунотерапевтического препарата «аффинолейкин» / А.Н. Мац // Биопрепараты. - 2004. - №4 (16). - С.5-31.
5. Chen Z. Short analytical review. Immune regulation of γ/δ T cells responses in mycobacterial infections / Z. Chen // Clin. Immunology. - 2005. - Vol.116. - P. 202-207.
6. Differentiation of effector memory V delta2 T cells and migratory routes in lymph nodes or inflammatory sites / F.Dieli [et al.] // J. Exp. Med. - 2003. - Vol. 18, №3. - P. 391-397.
- 7.Disease-specific changes in gammadelta T cell repertoire and function in patients with pulmonary tuberculosis / B.Li [et al.] // J.Immunol. - 1996. - Vol.157, №9. - P. 4222-4229.
8. Evidence for the involvement of lung-specific gammadelta T cell subsets in local responses to Streptococcus pneumoniae infection / A.C. Kirby [et al.] // Eur. J. Immunol. - 2007. - Vol. 37, №12. - P.3404-3413.
- 9.Gamma delta T cell responses associated with the development of tuberculosis in health care workers / D.J.Ordway [et al.] // FEMS Immunol. Med. Microbiol. - 2005. - Vol.143, №3. - P.339-350.
10. Macrophages exposed to Mycobacterium tuberculosis release chemokines able to recruit selected leucocyte subpopulations: focus on gammadelta cells / E. Ferrero [et al.] // Immunology. - 2003. - Vol.108, №3. - P.365-374.
11. Pulmonary V gamma 4+ gamma delta T cells have proinflammatory and antiviral effects in viral lung disease / J. Dodd [et al.] // J. Immunol. - 2009. - Vol. 182, №2. - P.1174-1181.
- 12.Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes reduce the viability of intracellular Mycobacterium tuberculosis / F. Dieli [et al.] // Eur. J. Immunol. - 2000. - Vol.30, №5. - P.1512-1519.