

БАКТЕРИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

М. Е. ДЬЯКОВА¹, Д. С. ЭСМЕДЛЯЕВА¹, Т. Л. ПЕРОВА¹, Н. Н. ПЕТРИЩЕВ², П. К. ЯБЛОНСКИЙ^{1,3}

¹ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

²ГБОУ ВПО «ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова» МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

³Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Бактерицидная активность лейкоцитов изучена у 63 больных впервые выявленным инфильтративным туберкулезом легких (ИТЛ) и 28 – фиброзно-кавернозным туберкулезом легких (ФКТ). Для больных с обеими клиническими формами туберкулеза характерна разнонаправленная кислородзависимая бактерицидная активность фагоцитирующих клеток: снижение показателей нитрозилирующего стресса, в большей степени характерное для больных ФКТ, и рост показателей оксидативного стресса, больше выраженного при ФКТ. Выявлена сопряженность функционирования иммунокомпетентных клеток, участвующих в бактерицидной функции: при ФКТ – между показателями оксидативного стресса, при ИТЛ – нитрозилирующего; отмечен синергический эффект респираторного взрыва. Если при хронической форме туберкулеза легких за бактерицидную функцию одинаково «отвечают» оба типа клеток, то при впервые выявленном нелеченном ИТЛ доминирующая роль отводится нейтрофилам как клеткам первой линии защиты. Полученные результаты дают основание полагать, что при впервые выявленном нелеченном туберкулезе легких важная роль в подавлении микобактерий туберкулеза отводится нитрозилирующему стрессу, а при хронической форме туберкулеза – оксидативному.

Ключевые слова: туберкулез, бактерицидная активность, нитрозилирующий и оксидативный стресс

Для цитирования: Дьякова М. Е., Эсмедляева Д. С., Перова Т. Л., Петрищев Н. Н., Яблонский П. К. Бактерицидная активность лейкоцитов у больных туберкулезом легких // Туберкулез и болезни лёгких. – 2017. – Т. 95, № 10. – С. 37-44. DOI: 10.21292/2075-1230-2017-95-10-37-44

BACTERICIDAL ACTIVITY OF LEUKOCYTES IN PULMONARY TUBERCULOSIS PATIENTS

M. E. DYAKOVA¹, D. S. ESMEDLYAEVA¹, T. L. PEROVA¹, N. N. PETRISCHHEV², P. K. YABLONSKY^{1,3}

¹Saint-Petersburg State Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russia

²Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia

³St. Petersburg University, St. Petersburg, Russia

Bactericidal activity of leukocytes was investigated in 63 patients with new infiltrate pulmonary tuberculosis and 28 patients with fibrous cavernous pulmonary tuberculosis. The diverse oxygen-dependent bactericidal activity of phagocytes is typical of the patients suffering from both clinical forms of tuberculosis: reduction of nitrosative stress rates, which is more frequent in those suffering from fibrous cavernous tuberculosis, and increase of oxidative stress rates, which is more intensive in case of fibrous cavernous tuberculosis. The associated functions were detected among immune-competent cells, involved in the bactericidal function: in case of fibrous cavernous tuberculosis – between oxidative stress rates, and in case of infiltrate pulmonary tuberculosis – between nitrosative stress rates; the synergistic effect of respiratory burst was observed. In case of chronic pulmonary tuberculosis, both types of cells were equally responsible for bactericidal functions, while neutrophils were dominating in new infiltrate pulmonary tuberculosis, without prior treatment, being the cells of the first line of defense. The obtained results allowed concluding that in case of new pulmonary tuberculosis without prior treatment, nitrosative stress played the important role in the killing of tuberculous mycobacteria, while in case of chronic tuberculosis – it was oxidative stress.

Key words: tuberculosis, bactericidal activity, nitrosative and oxidative stress

For citations: Dyakova M.E., Esmedlyaeva D.S., Perova T.L., Petrishev N.N., Yablonsky P.K. Bactericidal activity of leukocytes in pulmonary tuberculosis patients. *Tuberculosis and Lung Diseases*, 2017, Vol. 95, no. 10, P. 37-44. (In Russ.) DOI: 10.21292/2075-1230-2017-95-10-37-44

Реакция фагоцитирующих клеток на агрессию *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) признается наиболее ранним звеном патогенеза воспалительного процесса, предшествующим включению других механизмов, ответственных в конечном итоге за клинический его исход. С этой точки зрения представляется перспективным изучение функциональных свойств фагоцитирующих клеток, вовлеченных в формирование иммунного ответа и воспалительной реакции при туберкулезе. Именно в этом плане для оценки клеточного звена воспалительного процесса используются биохимические индикаторы функциональной активности клеток [1, 2, 23]. Реализацию бактерицидной функции связывают с респираторным (оксидантным) взрывом, характеризующимся

образованием большого количества активных форм кислорода. Среди активно исследуемых в последние годы молекул-эффекторов неспецифической резистентности, участвующих в уничтожении микробов, вирусов, злокачественных клеток, особое внимание уделяется оксиду азота (NO). Фагоцитирующие клетки продуцируют NO путем окисления L-аргинина с помощью фермента – индуцибельной NO-синтазы (iNOS). Как межклеточный и внутриклеточный мессенджер, оксид азота участвует в регуляции разнообразных метаболических реакций, обеспечивающих жизнеспособность и функциональную активность клеток и всего организма в целом [8, 11].

Важное место при изучении функциональной активности иммунокомпетентных клеток отводит-

ся выявлению особенностей межклеточного взаимодействия, которое может быть скоординировано или дезинтегрировано на различных этапах воспалительного процесса. Многокомпонентность составляющих патологического процесса при туберкулезе легких, предопределяющая различную ассоциированность, объясняет необходимость системного подхода при его изучении.

Данные литературы о важности нитрозилирующего стресса для бактерицидной функции лейкоцитов, как и сведения о содержании в клетках оксида азота при туберкулезе легких, противоречивы [4, 8, 12, 24], что и послужило основанием для проведения этого исследования.

Цель: изучить бактерицидную активность лейкоцитов у больных туберкулезом легких.

Материалы и методы

Обследован 91 больной туберкулезом легких: 63 – впервые выявленным инфильтративным (ИТЛ) [27 мужчин и 36 женщин в возрасте 16-65 лет (М-29,5)] и 28 – фиброзно-кавернозным туберкулезом легких (ФКТ) [21 мужчина и 7 женщин в возрасте 22,0-64,0 года (М-41,0)]. Обследование пациентов проводили до начала специфической противотуберкулезной химиотерапии. В референсную (контрольную) группу (РГ) включены 20 практически здоровых доноров с сопоставимыми характеристиками по полу и возрасту. Больные значительно не различались по наличию (+) или отсутствию (-) Mtb (Mtb- у 22,2 и 39,3%; Mtb+ у 77,8 и 60,7%), а также по массивности бактериовыделения (МБВ; низкая – МБВ-1- у 32,7 и 23,5%, высокая – МБВ-2 у 67,3 и 76,5% больных ИТЛ и ФКТ соответственно), но у больных ФКТ в 6,8 раза реже (7,7% против 52,1%, $p = 0,005$) регистрировались Mtb, чувствительные к противотуберкулезным препаратам.

Оксидативный стресс оценивали по тесту восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тесту): спонтанному (НСТс.), индуцированному зимозаном (НСТи.) и их соотношению (Инд.ст.), используемому для оценки функционального резерва клеток.

Нитрозилирующий стресс оценивали по генерации стабильных метаболитов NO, являющегося коротко живущей молекулой. Концентрацию общего ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$) и эндогенного (NO_2^-) нитрита, нитрата (NO_3^-) в мононуклеарах (мн) и нейтрофилах (н) определяли с помощью набора Total NO/Nitrite/Nitrate (R&D Systems, Канада), уровень индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) – набора Human iNOS Immunoassay (USCN, КНР).

Мононуклеары (мн) и нейтрофилы (н) выделяли из периферической крови в градиенте плотности (1,077) верографин – фикола [9].

Кислороднезависимую бактерицидную активность нейтрофилов изучали по активности эластазы (Эл) с использованием метода L. Visser и E. R. Blout.

В сыворотке крови исследовали уровень неоптерина (Нп) с применением иммуноферментного набора "MP Biomedicals Germany GmbH" (ФРГ); активность аденозиндезаминазы (АДА) и ее изоферментов (АДА-1 и АДА-2) определяли не только в сыворотке крови, но и лизатах моноцитов и нейтрофилов методом G. Giusti (1974).

Для оценки остроты процесса в сыворотке крови анализировали уровень реактантов острой фазы (РОФ): церулоплазмин (ЦП) определяли методом Равина, гаптоглобин (ГП), α_1 -кислый гликопротеин (АГП) – с использованием наборов фирмы Termo Fisher Scientific (США), α_1 -протеазный ингибитор (α_1 -ПИ), α_2 -макроглобулин (α_2 -МГ) – синтетического субстрата N- α -бензоил-L аргининпаранитроанилида.

Клинический анализ крови выполняли на гематологическом анализаторе Cell-Dyn Emerald (Abbott Laboratories, США).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 7.0. Метрические показатели представлены в виде среднего и ошибки среднего ($\bar{X} \pm m$), порядковые в виде минимум-максимум. Оценку достоверности различия метрических показателей проводили с использованием непараметрического U-критерия Вилкоксона – Манна – Уитни, проверку значимости результатов ранговых коэффициентов корреляции Спирмена – на основе статистики Стьюдента.

Результаты исследования

У больных ФКТ и ИТЛ по сравнению с РГ выявлены однонаправленные изменения уровней РОФ: рост активности α_1 -ПИ ($2,11 \pm 0,12$ и $2,10 \pm 0,05$ мкм/мл против $1,60 \pm 0,13$ мкмоль/мл, $p < 0,05$) и снижение уровня α_2 -МГ ($2,28 \pm 0,07$ и $2,18 \pm 0,05$ нмоль/мин против $2,55 \pm 0,13$ нмоль/мин, $p < 0,05$ соответственно). При обеих клинических формах туберкулеза уровни АГП ($1,21 \pm 0,11$ и $1,21 \pm 0,08$ г/л против $0,94 \pm 0,07$ г/л) и ЦП ($0,33 \pm 0,02$ и $0,31 \pm 0,01$ г/л против $0,34 \pm 0,01$ г/л при ФКТ и ИТЛ соответственно) значительно не отличались от референсных значений. Уровень ГП у больных ИТЛ был в пределах референсного диапазона ($1,32 \pm 0,08$ г/л против $1,02 \pm 0,06$ г/л), а у больных ФКТ был выше, чем у больных ИТЛ ($2,08 \pm 0,18$ г/л, $p = 0,0001$), что может свидетельствовать о тяжести специфического процесса у больных этой категории.

У больных обеих групп Нп определялся в пределах референсного диапазона из-за большой вариабельности индивидуальных значений ($9,40 \pm 1,31$ и $7,68 \pm 0,57$ нмоль/л против $5,60 \pm 0,42$ нмоль/л у больных ФКТ и ИТЛ соответственно). При этом уровень Нп выше пороговой величины ($\bar{X} + \sigma$) выявлялся у 54,0 и 59,0% больных ИТЛ и ФКТ соответственно. Также был проанализирован другой

маркер клеточного иммунитета – АДА, один из ключевых ферментов пуринового метаболизма, с состоянием которого связывают и функциональную активность фагоцитов [3]. У больных обеих групп выявлен рост экспрессии АДА-2 ($15,70 \pm 1,33$ и $16,3 \pm 0,83$ ед/л против $10,97 \pm 0,24$ ед/л, $p = 0,000...$), снижение активности АДА в мононуклеарах ($1,67 \pm 0,22$ и $2,02 \pm 0,13$ ед/ 10^6 клеток против $2,95 \pm 0,29$ ед/ 10^6 клеток, $p < 0,0001$) за счет уменьшения активности АДА-1 ($0,97 \pm 0,15$ ед/ 10^6 клеток и $1,42 \pm 0,13$ ед/ 10^6 клеток против $2,18 \pm 0,25$ ед/ 10^6 клеток, $p < 0,0001$; при ФКТ и ИТЛ соответственно). Степень снижения активности внутриклеточной АДА-1 зависела от клинической формы туберкулеза – при ФКТ она была выше ($p = 0,049$), чем при ИТЛ. При этом в обеих группах активность этого изофермента ниже $X + \sigma$ встречалась с одинаковой частотой (40,0 и 59,0% при ИТЛ и ФКТ соответственно, $p = 0,09$).

В нейтрофилах у больных ФКТ активность АДА и ее изоферментов определялась в пределах референсного диапазона. У больных ИТЛ было отмечено разнонаправленное изменение активности изоферментного спектра – снижение АДА-1 и рост АДА-2 при сохранении в пределах референсного диапазона общей активности АДА нейтрофилов.

Уровень показателя спонтанного оксидативного стресса мононуклеаров при ФКТ регистрировался в пределах референсного диапазона (рис. 1), а при ИТЛ был ниже, чем в группе сравнения ($p = 0,028$). Напротив, уровень индуцированного НСТ-теста при ИТЛ не отличался от референсных значений, а у больных ФКТ был выше ($p = 0,028$), чем у больных ИТЛ. При обеих клинических формах туберкулеза был отмечен рост индекса стимуляции ($2,72 \pm 0,22$ и $2,27 \pm 0,11$ против $1,86 \pm 0,14$ при ФКТ и ИТЛ соответственно), причем значения его выше $X + \sigma$ при ФКТ встречались чаще ($p = 0,01$), чем при ИТЛ.

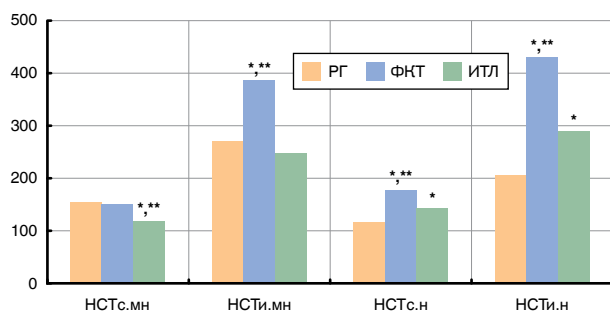


Рис. 1. Показатели оксидативного стресса лейкоцитов у больных анализируемых групп

Fig. 1. Rates of oxidative stress of leukocytes in the patients from two groups

У больных с обеими клиническими формами туберкулеза был отмечен рост базального и стимулированного уровней оксидативного стресса нейтрофилов по сравнению с референсными значениями. При ФКТ эти показатели НСТ-теста были выше,

чем при ИТЛ ($p < 0,03$). У больных ИТЛ отмечалось сохранение функционального резерва нейтрофилов ($2,17 \pm 0,095$ против $1,79 \pm 0,06$), а у больных ФКТ ($2,57 \pm 0,20$) – его рост ($p = 0,046$).

Показатели нитрозирующего стресса мононуклеаров были снижены независимо от формы туберкулеза (рис. 2.). У больных ИТЛ, в отличие от больных ФКТ, выявлялись значения метаболитов NO выше $X + \sigma$: уровни нитрата у 16,0% ($p = 0,025$) и тенденция к росту нитрита суммарного и эндогенного у 5,0% ($p = 0,2$). Генерация нейтрофилами нитрита суммарного и эндогенного, как и нитрата, была снижена у больных с обеими клиническими формами туберкулеза. При ИТЛ реже ($p = 0,03$), чем у больных ФКТ регистрировалась продукция нитрата нейтрофилами ниже $X - \sigma$. У больных ИТЛ была выявлена тенденция к росту суммарного нитрита – у 8,0% больных этот показатель был выше $X + \sigma$ ($p = 0,1$), при ФКТ 0%.

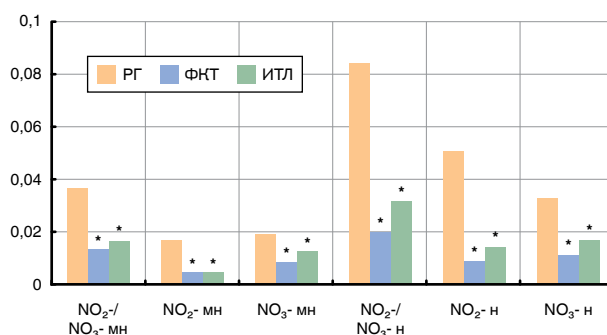


Рис. 2. Показатели нитрозирующего стресса лейкоцитов у больных анализируемых групп

Fig. 2. Rates of nitrosative stress of leukocytes in the patients from two groups

Активность Эл – показатель дегрануляционной и кислороднезависимой активности нейтрофилов, у больных ФКТ значимо не отличалась от референсных значений ($178,80 \pm 10,82$ против $157,60 \pm 5,34$ мЕ), тогда как у больных ИТЛ была выше, чем в группе сравнения ($204,05 \pm 5,17$ мЕ, $p = 0,01$).

У больных ФКТ и ИТЛ экспрессия iNOS в мононуклеарах ($4,5 \pm 0,74$ и $3,95 \pm 0,43$ нг/ 10^6 клеток против $3,92 \pm 1,4$ нг/ 10^6 клеток) и в нейтрофилах ($3,50 \pm 0,57$ и $2,55 \pm 0,37$ нг/ 10^6 клеток против $1,3 \pm 0,05$ нг/ 10^6 клеток соответственно) не отличалась ни между клиническими формами туберкулеза, ни от референсных значений.

У больных ФКТ процент палочкоядерных нейтрофилов был выше, чем при ИТЛ, $p = 0,0009$ ($5,55 \pm 0,69$ против $2,90 \pm 0,38$ при ФКТ и ИТЛ соответственно).

В целом, для больных с обеими клиническими формами туберкулеза характерна активация мононуклеарных фагоцитов, судя по уровню Нп и активности АДА-2 (между этими показателями выявлены положительные корреляции – $r = 0,45$; $p = 0,04$ и

$r = 0,40$; $p = 0,003$ при ФКТ и ИТЛ соответственно), а также по функциональному резерву их микробицидной активности, более высокому при ФКТ. Напротив, генерация NO этими клетками была снижена, сильнее при ФКТ. Кислородзависимая оксидативная бактерицидная активность нейтрофилов была выше при ФКТ, а кислороднезависимая – при ИТЛ. Показатели нитрозилирующего стресса нейтрофилов были снижены в обеих группах, сильнее при ФКТ. Выявленные закономерности характерны и для больных с массивным бактериовыделением и ЛУ туберкулезом легких.

Соотношение характеристик кислородзависимой бактерицидной функции лейкоцитов было связано с клинической формой туберкулеза. При ФКТ выявлены взаимосвязи между спонтанными и стимулированными показателями НСТ-теста как в нейтрофилах, так и в мононуклеарах, что свидетельствовало об однонаправленности изменений показателей оксидативной бактерицидной функции лейкоцитов и позволяло говорить о сопряженности их функционирования. Напротив, у больных ИТЛ часть связей отсутствовала (рис. 3). В обеих группах обнаружены связи между индексами стимуляции мононуклеаров и нейтрофилов ($r = 0,54$; $0,63$; $p < 0,004$). При ИТЛ уровень функционального резерва клеток зависел от массивности бактериовыделения ($r = -0,31$; $p = 0,013$).

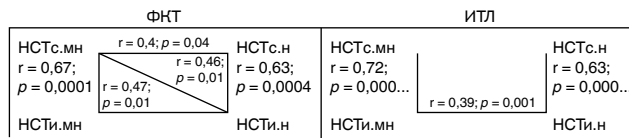


Рис. 3. Соотношение характеристик НСТ-теста лейкоцитов у больных анализируемых групп

Fig. 3. Correlation of parameters of NBT test in leukocytes in the patients from two groups

При ИТЛ выявлены корреляции между показателями нитрозилирующего стресса мононуклеаров и нейтрофилов: между $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ мн и $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ н ($r = 0,51$; $p = 0,00002$), между NO_2^- мн и NO_2^- н ($r = 0,50$; $p = 0,00003$), между NO_3^- мн и NO_3^- н ($r = 0,57$; $p = 0,000001$). Полученные корреляции между показателями оксидативного стресса при ФКТ и нитрозилирующего при ИТЛ, вероятно, позволяют говорить о кооперации мононуклеарных фагоцитов и полиморфно-ядерных лейкоцитов, которая обеспечивает функционирование единого фагоцитарного клеточного домена, играющего ключевую роль в элиминации Mtb. При ИТЛ отмеченное скоординированное межклеточное взаимодействие не зависело от характеристик Mtb. Напротив, при ФКТ у больных с массивным бактериовыделением ЛУ штаммов Mtb наблюдалось дезинтегрирование межклеточного взаимодействия, касающееся в большей степени нейтрофилов.

При ИТЛ отмечена взаимосвязь между показателями оксидативной и нитрозилирующей бактерицидной активности мононуклеаров (NO_2^- мн и НСТи.мн; $r = 0,27$; $p = 0,03$). При ФКТ эти взаимосвязи появлялись у больных с массивным бактериовыделением (НСТс.мн и $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ мн; НСТи.мн и $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ мн, NO_2^- мн; $r > 0,5$; $p < 0,04$). Выявленные взаимодействия между показателями оксидативного и нитрозилирующего стресса являются важным ключом к возникновению синергического эффекта респираторного взрыва и синтезу NO [11].

У больных ИТЛ также отмечена согласованность кислороднезависимой (Эл) и кислородзависимой (NO_2^- н) бактерицидной активности нейтрофилов ($r = 0,28$; $p = 0,025$).

При ИТЛ были зарегистрированы взаимосвязи между продукцией NO и индуцибельной NO-синтазой в обоих видах клеток (iNOSн и $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ н; $r = 0,50$; $p = 0,018$; iNOSмн и NO_3^- мн; $r = 0,63$; $p = 0,0016$), а при ФКТ – только в мононуклеарах (iNOSмн и NO_3^- мн; $r = 0,45$; $p = 0,017$).

При обеих клинических формах туберкулеза выявлены корреляции между уровнем α_1 -ПИ и генерацией NO (табл.). С одной стороны, α_1 -ПИ инактивируется окислительным (нитрозилирующим) метаболизмом, что ослабляет противомикробные процессы, с другой – после нитрозилирования α_1 -ПИ не только сохраняет свои свойства, но и приобретает новые, в частности, антибактериальные [20]. Интересно отметить, что при ФКТ выявлена корреляция между активностью протеазного ингибитора и генерацией суммарного нитрита мононуклеарами, а при ИТЛ – продукцией метаболитов NO нейтрофилами, что согласуется с исследованиями Mir M. M. [18], показавшими в условиях эксперимента, что оксид азота защищает α_1 -ПИ от оксидативной инактивации активированными полиморфно-ядерными нейтрофилами. При ИТЛ была выявлена негативная корреляция между генерацией нитрата мононуклеарами и другим ингибитором протеиназ – α_2 -МГ, который, как и α_1 -ПИ, имеет высокое сродство к поверхностным рецепторам клеточных мембран, активация которых увеличивает уровень cAMP, выполняющего ключевую роль в регуляции множества клеточных функций [14].

В обеих группах были отмечены связи между уровнем АГП и характеристиками бактерицидной активности мононуклеаров: показателями оксидативного стресса при ФКТ и нитрозилирующего – при ИТЛ. Выявленные связи иллюстрируют с одной стороны, возможность АГП индуцировать как провоспалительный, так и противовоспалительный эффекты в зависимости от фазы заболевания. Противовоспалительные цитокины могут подавлять продукцию TNF- α и, следовательно, синтез NO [19], хотя Куо Н.-Р. et al. [16] предполагают, что NO регулирует продукцию TNF- α и при определенных условиях оксид азота может подавлять

Таблица. Результаты корреляционного анализа между анализируемыми показателями у больных ФКТ и ИТЛ
Table. Results of correlation analysis between analyzed parameters in those suffering from fibrous cavernous tuberculosis and infiltrate pulmonary tuberculosis

Показатели		ФКТ	ИТЛ
α_1 -ПИ	$\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^- \text{ мн}$	$r = 0,42; p = 0,04$	–
	$\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^- \text{ н}$	–	$r = 0,46; p = 0,0006$
	$\text{NO}_2^- \text{ н}$	–	$r = 0,28; p = 0,04$
	$\text{NO}_3^- \text{ н}$	–	$r = 0,4; p = 0,003$
α_2 -МГ	$\text{NO}_3^- \text{ мн}$	–	$r = -0,34; p = 0,01$
	$\text{NO}_2^- \text{ мн}$	–	$r = -0,27; p = 0,04$
АГП	НСТс.мн	$r = 0,57; p = 0,007$	–
	НСТи.мн	$r = 0,46; p = 0,035$	–
ЦП	$\text{NO}_2^- \text{ н}$	–	$r = -0,3; p = 0,03$
Нп	НСТи.н	–	$r = -0,34; p = 0,01$
	ИНДст.н	–	$r = -0,33; p = 0,016$
	НСТс.мн	$r = 0,51; p = 0,02$	–
АДАН	НСТс.н	$r = -0,77; p = 0,000003$	–
	НСТи.н	$r = -0,68; p = 0,00008$	–
	$\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^- \text{ н}$	–	$r = 0,44; p = 0,0003$
	$\text{NO}_2^- \text{ н}$	–	$r = 0,51; p = 0,02$
	$\text{NO}_3^- \text{ н}$	–	$r = 0,37; p = 0,003$
АДА-1н	НСТс.н	$r = -0,74; p = 0,00001$	–
	НСТи.н	$r = -0,69; p = 0,00007$	–
	$\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^- \text{ н}$	–	$r = 0,36; p = 0,0003$
	$\text{NO}_2^- \text{ н}$	–	$r = 0,41; p = 0,004$
	$\text{NO}_3^- \text{ н}$	–	$r = 0,28; p = 0,026$
АДАмн	НСТи.мн	$r = -0,40; p = 0,04$	–
	$\text{NO}_2^- \text{ мн}$	–	$r = 0,26; p = 0,037$
АДА-1мн	$\text{NO}_2^- \text{ мн}$	–	$r = 0,32; p = 0,0095$

продукцию цитокинов. С другой стороны, АГП способен регулировать оксидативный метаболизм в зависимости от его уровня [13]. Выявленная при ИТЛ обратная корреляционная зависимость между уровнем ЦП и генерацией нитрита нейтрофилами отражает свойственное церулоплазмину, связывающему медь, прямое антибактериальное действие, модулирующее действие на фагоцитарную активность мононуклеаров и нейтрофилов [5].

Отмеченные корреляции в обеих группах между Нп и показателями НСТ-теста иллюстрируют участие Нп в бактерицидной функции фагоцитирующих клеток. Неоптерин сопряжен с «оксидативным взрывом» моноцитов/макрофагов и дозозависимо нейтрофилов [7]. У больных ФКТ отмечена отрицательная взаимосвязь между уровнем Нп и экспрессии iNOSн ($r = -0,50; p = 0,025$). У больных ИТЛ с массивным бактериовыделением и ЛУ Mtb выявлена положительная корреляция между уровнями Нп и экспрессии iNOSмн ($r > 0,6; p < 0,05$). Данные литературы по этому вопросу противоречивы. С одной стороны, дефицит тетрагидробиоптерина, ключевого кофактора для iNOS, может привести к снижению способности иммунокомпетентных кле-

ток генерировать оксид азота [7], с другой – уровень iNOS не зависит от тетрагидробиоптерина [10].

Проведенный корреляционный анализ между показателями внутриклеточной АДА и бактерицидной активностью фагоцитирующих клеток выявил участие АДА в оксидативном стрессе при ФКТ и нитрозилирующем – при ИТЛ. Пуриновый катаболизм является источником активных форм кислорода в макрофагах и нейтрофилах. АДА катализирует первую реакцию метаболического пути на ксантиноксидазу, образующую супероксид в реакциях окисления ксантина и гипоксантина. Также ксантиноксидаза может способствовать продукции NO и обеспечивает возможность восстановления NO_3^- в NO_2^- [6, 17]. Ферменты пуринового метаболизма регулируют уровень аденозина, играющего важную роль в регуляции метаболизма фагоцитирующих лейкоцитов. Ранее показано, что для больных ФКТ, в отличие от больных ИТЛ, характерен дисбаланс между поступлением аденозина и его дезаминированием [3]. АДА способна усиливать генерацию O_2^- нейтрофилами, снижая ингибирующее действие системы аденозин/сАМР и активируя рецептор A_1 [15]. В то же время аденозин, действуя на A_2 -рецепторы (через сАМР-зависимый путь), может индуцировать продукцию NO и радикалов кислорода [12]. В свою очередь, NO может сам регулировать сАМР-зависимые метаболические процессы [6].

Вышеотмеченные взаимосвязи между исследуемыми показателями подтверждают предположение Nagy G. et al. [21], что оксид азота в зависимости от концентрации может обладать противовоспалительными свойствами, возможностью модулировать функции Т-клеток, обеспечивать подавление МБТ.

Корреляционный анализ выявил ведущую роль оксида азота в патогенезе впервые выявленного нелеченного ИТЛ, а при хронической форме туберкулеза на первый план выходят показатели оксидативного стресса.

Причины снижения секреции оксида азота неоднозначны. Микробицидное действие NO может зависеть от образования высокореактивных форм – пероксинитрита (ONOO^-), образующегося в реакции NO и супероксид-аниона. В свою очередь, из пероксинитрита могут высвобождаются радикалы диоксида азота и OH-радикалы [11]. Отмеченное выше у больных ФКТ и ИТЛ синергичное взаимодействие двух биоцидных систем (оксидативной и нитрозилирующей), вероятно, может косвенно указывать как раз на формирование пероксинитрита. Интересно, что у больных исследуемых клинических форм туберкулеза с ЛУ Mtb выявлены разнонаправленные корреляции между показателями оксидативной (NO_2^-) и нитрозилирующей (НСТи) биоцидной системы мононуклеаров: положительная при ИТЛ ($r = 0,43; p = 0,04$) и негативная при ФКТ ($r = -0,58; p = 0,046$). С одной стороны, при ИТЛ, вероятно, происходит равномерное об-

разование из пероксинитрита ОН-радикалов и радикалов диоксида азота, а при ФКТ превалирует образование ОН-радикалов. Косвенным подтверждением этого могут служить выявленные при ФКТ корреляции – положительные между процентом палочкоядерных нейтрофилов и уровнем спонтанного/индуцированного НСТ-теста нейтрофилов ($r = 0,5$; $p = 0,017/0,006$ соответственно); отрицательные между процентом палочкоядерных нейтрофилов и секрецией общего нитрита нейтрофилами ($r = -0,55$; $p = 0,04$). С другой стороны, цикл окиси азота можно рассматривать как один из механизмов регуляции кислородных метаболитов. Стрелис А. К. и др. [8] полагали, что снижение продукции оксида азота может быть связано с функциональной инертностью лейкоцитов, но вышеприведенные данные о значимом росте/сохраненном функциональном резерве (по данным НСТ-теста) лейкоцитов у больных ФКТ и ИТЛ опровергают данное предположение. У больных ФКТ нельзя исключить причину снижения секреции оксида азота фагоцитирующими клетками вследствие токсического влияния на них противотуберкулезных препаратов, что косвенно подтверждает выявленная у больных этой категории обратная взаимосвязь между длительностью лечения ($M = 4,0$; 0-14 лет) и продукцией $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ нейтрофилами ($r = -0,43$; $p = 0,048$). Причиной снижения оксида азота, вероятно, может быть то, что гранулоциты и мононуклеары крови человека характеризуются низким уровнем продукции NO, в то же время в макрофагах человека, в том числе альвеолярных из воспалительных очагов, может наблюдаться достаточно высокая индукция экспрессии NO-синтазы и оксида азота в ответ на цитокины и бактериальные липополисахариды [22].

Заключение

Для больных ИТЛ и ФКТ характерны:

- разнонаправленная кислородзависимая бактерицидная активность фагоцитирующих клеток:

снижение показателей нитрозилирующего стресса, в большей степени характерное для больных ФКТ, и рост показателей оксидативного стресса, больше выраженного при ФКТ;

- сопряженность функционирования иммунокомпетентных клеток, участвующих в бактерицидной функции: при ФКТ – между показателями оксидативного стресса, при ИТЛ – нитрозилирующего;
- синергический эффект респираторного взрыва.

Следует отметить, что на координацию межклеточного взаимодействия у больных хронической формой туберкулеза «оказывает влияние» наличие Mtb, их массивность и лекарственная устойчивость.

У больных ИТЛ отмечены рост кислороднезависимой бактерицидной активности нейтрофилов и ее согласованность с кислородзависимой активностью.

Источником NO в фагоцитирующих клетках при ИТЛ, кроме L-аргинина, являются аденозиндезаминаза и пероксинитрит. При ФКТ в мононуклеарах – L-аргинин и пероксинитрит, а в нейтрофилах, вероятно, только пероксинитрит. Таким образом, L-аргинин при туберкулезе, вероятно, не является единственным источником NO.

Анализ взаимосвязей показателей бактерицидной функции фагоцитирующих клеток с РОФ, маркерами клеточного иммунитета у больных ФКТ и ИТЛ позволил выявить многокомпонентность составляющих бактерицидную активность иммунокомпетентных клеток.

Если при ФКТ легких за бактерицидную функцию одинаково «отвечают» оба типа клеток, то при впервые выявленном нелеченном ИТЛ доминирующая роль отводится нейтрофилам как клеткам первой линии защиты.

Полученные результаты дают основание полагать, что при впервые выявленном нелеченном туберкулезе легких важная роль в подавлении Mtb отводится нитрозилирующему стрессу, а при хронически активном туберкулезе – оксидативному.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.

Conflict of Interests. The authors state that they have no conflict of interests.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абдуллаев Р. Ю., Каминская Г. О., Комиссарова О. Г. Сдвиги в системе гемостаза – компонент синдрома системного воспалительного ответа при туберкулезе легких // *Врач.* – 2012. – № 2. – С. 24-28.
2. Дьякова М. Е., Титаренко О. Т., Эсмедьяева Д. С., Елькин А. В., Табанаква И. А., Алексеева Н. П. Функциональная активность фагоцитирующих клеток у больных фиброзно-кавернозным туберкулезом // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.* – 2008. – № 2. – С. 15-19.
3. Дьякова М. Е. Особенности пуринового метаболизма у больных туберкулезом легких // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* – 2016. – Т. 61, № 3. – С. 36-42.
4. Каминская Г. О., Абдуллаев Р. Ю., Серебряная Б. А. Качественная оценка метаболических сдвигов, сопутствующих остро прогрессирующему течению туберкулеза легких // *Пробл. туб.* – 2006. – № 8. – С. 53-57.

REFERENCES

1. Abdullaev R.Yu., Kaminskaya G.O., Komissarova O.G. Changes in hemostasis system – components of system inflammatory response syndrome in pulmonary tuberculosis. *Vrach*, 2012, no. 2, pp. 24-28. (In Russ.)
2. Dyakova M.E., Titarenko O.T., Esmedyaeva D.S., Elkin A.V., Tabanakova I.A., Alekseeva N.P. Functional activity of phagocytes in fibrous cavernous tuberculosis. *Voprosy Biologicheskoy, Meditsinskoy i Farmatsevticheskoy Khimii*, 2008, no. 2, pp. 15-19. (In Russ.)
3. Dyakova M.E. Specific features of purine metabolism in pulmonary tuberculosis patients. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimentalnaya Terapiya*, 2016, vol. 61, no. 3, pp. 36-42. (In Russ.)
4. Kaminskaya G.O., Abdullaev R.Yu., Serebryanaya B.A. Quality evaluation of metabolic changes associated with fast progressing pulmonary tuberculosis. *Probl. Tub.*, 2006, no. 8, pp. 53-57. (In Russ.)

5. Каримов И. З., Шавловский М. М., Назаров П. Г. Изменение содержания С-реактивного белка и других белков острой фазы в крови больных вирусным гепатитом // Цитокины и воспаление. – 2004. – Т. 3, № 4. – С. 42-46.
6. Реутов В. П. Цикл окиси азота в организме млекопитающих // Успехи биологической химии. – 1995. – Т. 35. – С. 189-228.
7. Свиридов Е. А., Телегина Т. А. Неоптерин и его восстановленные формы: биологическая роль и участие в клеточном иммунитете // Успехи биологической химии. – 2005. – Т. 45. – С. 355-390.
8. Стрелис А. К., Новицкий В. В., Уразова О. И., Земляная Н. А., Воронкова О. В., Филинук О. В., Пирогова Н. П., Серебрякова В. А., Буйнова Л. Н., Есимова И. Е. Продукция оксида азота мононуклеарами крови у больных лекарственно-чувствительным и лекарственно-устойчивым туберкулезом легких // Бюллетень сибирской медицины. – 2006. – Т. 5, № 4. – С. 57-61.
9. Тотолян А. А., Балдueva И. А., Бубнова Л. Н., Закревская А. В., Зуева Е. Е., Калинина Н. М., Лисицина З. Н. Стандартизация методов иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга человека // Клиническая лабораторная диагностика. – 2001. – № 8. – С. 38-45.
10. Bryan N. S., Bian K., Murad F. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development // Front. Biosci. – 2009. – Vol. 14, № 1. – P. 1-18. doi: 10.2741/3228.
11. Chakravorty D., Hensel M. Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens // Microbes Infect. – 2003. – Vol. 4. – P. 621-627. doi: 10.1016/S1286-4579(03)00096-0.
12. Chan E. D., Chan J., Schluger N. W. What is the role of nitric oxide in murine and human defense against tuberculosis? // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. – 2001. – Vol. 25. – P. 606-612.
13. Hocheple T., Berger F., Baumann H., Libert C. Alpha-1-acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties // Cytokine Growth Factor Rev. – 2003. – Vol. 14, № 1. – P. 25-34.
14. Janciauskiene S. M., Nita J. M., Stevens T. Alpha1-antitrypsin, old dog, new tricks. α 1-antitrypsin exerts in vitro antiinflammatory activity in human monocytes by elevating cAMP // J. Biol. Chem. – 2007. – Vol. 282. – P. 8573-8582. doi: 10.1074/jbc.M607976200.
15. Kälvegren H., Fridfeldt J., Bengtsson T. The role of plasma adenosine deaminase in chemoattractant-stimulated oxygen radical production in neutrophils // Eur. J. Cell Biol. – 2010. – Vol. 89, № 6. – P. 462-467. doi:10.1016/j.ejcb.2009.12.004.
16. Kuo H.-P., Wang C.-H., Huang K.-S., Lin H.-C., Yu C.-T., Liu C.-Y., Lu L.-C. Nitric oxide modulates interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α synthesis by alveolar macrophages in pulmonary tuberculosis // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2001. – Vol. 161. – P. 192-199.
17. Maiuolo J., Oppedisano F., Gratteri S., Muscoli C., Mollace V. Regulation of uric acid metabolism and excretion // Int. J. Cardiology. – 2016. – Vol. 213. – P. 8-14. doi: 10.1016/j.ijcard.2015.08.109.
18. Mir M. M., Khan A. R., Dar N. A., Salahuddin M. Polymorphonuclear leukocyte mediated oxidative inactivation of alpha-1-proteinase inhibitor: modulation by nitric oxide // Indian J. Clin. Biochem. – 2005. – Vol. 20, № 1. – P. 184-192. doi:10.1007/BF02893068.
19. Miranda M. S., Wek Rodrigues K., Cordero E. M., Rojas-Espinosa O. Expression of cyclooxygenase-2, alpha 1-acid-glycoprotein and inducible nitric oxide synthase in the developing lesions of murine leprosy // Int. J. Exp. Path. – 2006. – Vol. 87. – P. 485-494. doi: 10.1111/i.1365-2613.2006.00504.
20. Miyamoto Y., Akaike T., Maeda H. S-nitrosylated human alpha(1)-protease inhibitor // Biochim. Biophys. Acta. – 2000. – Vol. 1477. – P. 90-97.
21. Nagy G., Koncz A., Telarico T., Fernandez D., Ersek B., Buzas E., Perl A. Central role of nitric oxide in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus // Arthritis Research & Therapy. – 2010. – Vol. 12. – P. 210. doi: 10.1186/ar3045.
22. Shiloh M. U., Nathan C. F. Reactive nitrogen intermediates and the pathogenesis of Salmonella and Mycobacteria // Curr. Opin. Microbiol. – 2000. – Vol. 3. – P. 35-42.
23. Titarenko O. T., Dyakova M. E., Esmedlyayeva D. S., Pavlova M. V., Yelkin A. V., Alekseeva N. P., Bondarenko B. B. Peculiarities of functional activity of circulating phagocytes in patients with different forms of drug-resistant pulmonary tuberculosis // Biochem. (Mosc.) Suppl. Series B: Biomedical Chemistry. – 2011. – Vol. 5, № 3. – P. 301-306.
24. Yang C.-S., Yuk J.-M., Jo E.-K. The role of nitric oxide in mycobacterial infections // Immune Netw. – 2009. – Vol. 9, № 2. – P. 46-52. doi: 10.4110/in.2009.9.2.46.
5. Karimov I.Z., Shavlovskiy M.M., Nazarov P.G. Changes in level of C-reactive protein and other proteins of acute phase in the blood of viral hepatitis patients, *Tsitokiny i Vospaleniye*, 2004, vol. 3, no. 4, pp. 42-46. (In Russ.)
6. Reutov V.P. Cycle of nitrogen oxides in the mammals. *Uspekhi Biologicheskoy Khimii*, 1995, vol. 35, pp. 189-228. (In Russ.)
7. Sviridov E.A., Telegina T.A. Neopterin and its reduced forms: biological role and involvement into the cellular immunity. *Uspekhi Biologicheskoy Khimii*, 2005, vol. 45, pp. 355-390. (In Russ.)
8. Strelis A.K., Novitskiy V.V., Urazova O.I., Zemlyanaya N.A., Voronkova O.V., Filinyuk O.V., Pirogova N.P., Serebryakova V.A., Buynova L.N., Esimova I.E. Production of nitrogen oxide by mononuclear cells of those with drug susceptible and drug resistant pulmonary tuberculosis. *Bulleten' Sibirskoy Meditsiny*, 2006, vol. 5, no. 4, pp. 57-61. (In Russ.)
9. Totolyan A.A., Baldueva I.A., Bubnova L.N., Zakrevskaya A.V., Zueva E.E., Kalinina N.M., Lisitsina Z.N. Standardization of immune-phenotyping methods of human blood and bone marrow cells. *Klin. Laboratornaya Diagnostika*, 2001, no. 8, pp. 38-45. (In Russ.)
10. Bryan N.S., Bian K., Murad F. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development. *Front. Biosci.*, 2009, vol. 14, no. 1, pp. 1-18. doi: 10.2741/3228.
11. Chakravorty D., Hensel M. Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens. *Microbes Infect.*, 2003, vol. 4, pp. 621-627. doi: 10.1016/S1286-4579(03)00096-0.
12. Chan E.D., Chan J., Schluger N.W. What is the role of nitric oxide in murine and human defense against tuberculosis? *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2001, vol. 25, pp. 606-612.
13. Hocheple T., Berger F., Baumann H., Libert C. Alpha-1-acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2003, vol. 14, no. 1, pp. 25-34.
14. Janciauskiene S.M., Nita J.M., Stevens T. Alpha1-antitrypsin, old dog, new tricks. α 1-antitrypsin exerts in vitro antiinflammatory activity in human monocytes by elevating cAMP. *J. Biol. Chem.*, 2007, vol. 282, pp. 8573-8582. doi: 10.1074/jbc.M607976200.
15. Kälvegren H., Fridfeldt J., Bengtsson T. The role of plasma adenosine deaminase in chemoattractant-stimulated oxygen radical production in neutrophils. *Eur. J. Cell Biol.*, 2010, vol. 89, no. 6, pp. 462-467. doi:10.1016/j.ejcb.2009.12.004.
16. Kuo H.P., Wang C.H., Huang K.S., Lin H.C., Yu C.T., Liu C.Y., Lu L.C. Nitric oxide modulates interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α synthesis by alveolar macrophages in pulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 161, pp. 192-199.
17. Maiuolo J., Oppedisano F., Gratteri S., Muscoli C., Mollace V. Regulation of uric acid metabolism and excretion. *Int. J. Cardiology*, 2016, vol. 213, pp. 8-14. doi: 10.1016/j.ijcard.2015.08.109.
18. Mir M.M., Khan A. R., Dar N.A., Salahuddin M. Polymorphonuclear leukocyte mediated oxidative inactivation of alpha-1-proteinase inhibitor: modulation by nitric oxide. *Indian J. Clin. Biochem.*, 2005, vol. 20, no. 1, pp. 184-192. doi:10.1007/BF02893068.
19. Miranda M.S., Wek Rodrigues K., Cordero E.M., Rojas-Espinosa O. Expression of cyclooxygenase-2, alpha 1-acid-glycoprotein and inducible nitric oxide synthase in the developing lesions of murine leprosy. *Int. J. Exp. Path.*, 2006, vol. 87, pp. 485-494. doi: 10.1111/i.1365-2613.2006.00504.
20. Miyamoto Y., Akaike T., Maeda H. S-nitrosylated human alpha(1)-protease inhibitor. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2000, vol. 1477, pp. 90-97.
21. Nagy G., Koncz A., Telarico T., Fernandez D., Ersek B., Buzas E., Perl A. Central role of nitric oxide in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy*, 2010, vol. 12, pp. 210. doi: 10.1186/ar3045.
22. Shiloh M.U., Nathan C.F. Reactive nitrogen intermediates and the pathogenesis of Salmonella and Mycobacteria. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2000, vol. 3, pp. 35-42.
23. Titarenko O.T., Dyakova M.E., Esmedlyayeva D.S., Pavlova M.V., Yelkin A.V., Alekseeva N.P., Bondarenko B.B. Peculiarities of functional activity of circulating phagocytes in patients with different forms of drug-resistant pulmonary tuberculosis. *Biochem. (Mosc.) suppl. Series B: Biomedical Chemistry*, 2011, vol. 5, no. 3, pp. 301-306.
24. Yang C.S., Yuk J.M., Jo E.K. The role of nitric oxide in mycobacterial infections. *Immune Netw.*, 2009, vol. 9, no. 2, pp. 46-52. doi: 10.4110/in.2009.9.2.46.

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

ФГБУ «СПбНИИФ» МЗ РФ,
194064, Санкт-Петербург,
ул. Политехническая, д. 32.
Тел.: 8 (812) 297-86-03.

Дьякова Марина Евгеньевна

кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник.
E-mail: marinadyakova@yandex.ru

Эсмедляева Диляра Салиевна

кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник.
E-mail: diljara-e@yandex.ru

Перова Татьяна Леонидовна

научный сотрудник.
tanyaphome@yandex.ru

Яблонский Петр Казимирович

доктор медицинских наук, профессор, директор.
Тел.: 8 (812) 579-25-54.
E-mail: piotr_yablonskii@mail.ru

Петрищев Николай Николаевич

ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский
государственный медицинский университет
им. акад. И. П. Павлова»,
доктор медицинских наук, профессор,
руководитель центра лазерной медицины.
197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8.
Тел.: 8 (812) 499-70-69.
E-mail: lasmed@yandex.ru

FOR CORRESPONDENCE:

Saint-Petersburg State Research Institute
of Phthisiopulmonology,
32, Polytechnicheskaya St., St. Petersburg, 194064.
Phone: +7 (812) 297-86-03.

Marina E. Dyakova

Candidate of Biological Sciences,
Senior Researcher.
E-mail: marinadyakova@yandex.ru

Dilyara S. Esmedlyayeva

Candidate of Biological Sciences,
Senior Researcher.
E-mail: diljara-e@yandex.ru

Tatiana L. Perova

Researcher.
E-mail: tanyaphome@yandex.ru

Petr K. Yablonsky

Doctor of Medical Sciences, Professor, Director.
Phone: +7 (812) 579-25-54.
E-mail: piotr_yablonskii@mail.ru

Nikolay N. Petrishchev

Pavlov First Saint Petersburg
State Medical University,
Doctor of Medical Sciences, Professor,
Head of Laser Medicine Center.
6-8, Lva Tolstogo St.,
St. Petersburg, 197022
Phone: +7 (812) 499-70-69.
E-mail: lasmed@yandex.ru

Поступила 23.03.2017

Submitted as of 23.03.2017