

## TNF- $\alpha$ , sCD8 and sIL-2R LEVELS in PBMC CULTURE SUPERNATANTS of CHILDREN with PULMONARY TUBERCULOSIS

(Received 5 January, 1995)

I. B. Barlan, M.D.<sup>\*\*\*\*</sup> / M.M. Başaran, M.D.<sup>\*</sup>  
S. Bilsel, Ph.D.<sup>\*\*\*</sup> / Y. Tağa, M.D.<sup>\*\*</sup>

<sup>\*</sup> *Professor, Division of Pediatric Allergy-Immunology, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Marmara University, Istanbul, Turkey.*

<sup>\*\*</sup> *Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Marmara University, Istanbul, Turkey.*

<sup>\*\*\*</sup> *Associate Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Marmara University, Istanbul, Turkey.*

<sup>\*\*\*\*</sup> *Assistant Professor, Division of Pediatric Allergy - Immunology, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Marmara University, Istanbul, Turkey.*

### SUMMARY

This study was undertaken to investigate the impact of Mycobacterium tuberculosis (M. tuberculosis) infection on in-vitro production of tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), soluble CD8 (sCD8) and soluble IL-2 receptor (sIL-2R) by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from children with pulmonary tuberculosis (TB) versus controls.

PBMCs from 8 children with newly diagnosed pulmonary TB were stimulated with PHA and LPS either separately or in combination. Five healthy children and 4 adults were used as controls. Cell free supernatants were assayed for the presence of TNF- $\alpha$ , sCD8 and sIL-2R with a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Although the median of TNF- $\alpha$  production was significantly higher in the unstimulated supernatants of patients (42.5pg/ml, 20.0-320.0) when compared to controls (15pg/ml, 0-90.0) ( $p < 0.05$ ) determination of sCD8 and sIL-2R levels revealed no significant difference between the patients and controls.

Our findings indicated that PBMC obtained from children with TB spontaneously secreted high levels of TNF- $\alpha$  which may exert immunoregulatory effects and thus mediate some of the clinical manifestations of tuberculosis.

**Key Words :** TNF- $\alpha$ , sCD8, sIL-2R, tuberculosis

### INTRODUCTION

TNF- $\alpha$  seems to be involved in tuberculosis immunology both by promoting activation of

mycobactericidal mechanisms in human macrophages as well as contributing to tissue destruction (1). It has been shown by Wright et al that in vivo activated peripheral blood monocytes (PBMs) from AIDS patients spontaneously released high levels of TNF- $\alpha$  whereas little TNF- $\alpha$  was produced by normal PBMs (2). Thus we sought to investigate whether PBMC of TB patients secrete high levels of TNF- $\alpha$  either spontaneously or in response to stimulation.

Both the CD4+ and CD8+ T-cell subsets are likely to be important in the protective response to M. tuberculosis. Mice that were depleted of either CD4+ T cells or CD8+T-cells and then infected with M. tuberculosis showed increased numbers of bacteria indicating an inability to control the infection (3). Soluble CD8 may be of value in monitoring the involvement of CD8+ T cells in response to M. tuberculosis infection as in viral infections.

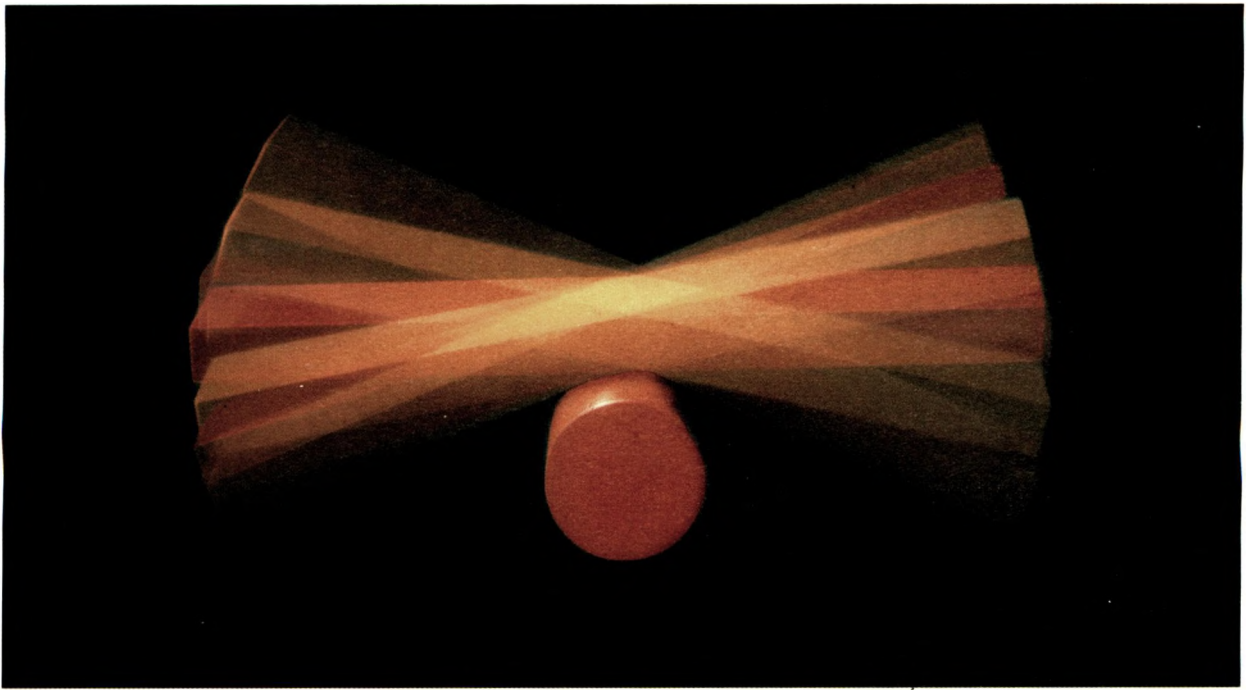
M. tuberculosis activated T cells express IL-2R and produce IL-2 upon specific restimulation. Thus an autocrine IL-2 pathway may participate in T cell activation by mycobacteria (4).

The present study was undertaken to examine the effect of M. Tuberculosis infection on in vitro production of TNF- $\alpha$ , sCD8 and sIL-2R in response to mitogen and/or LPS stimulation.

### MATERIALS and METHODS

#### Subjects

Eight children (7 males, 1 female, 1-13 years old, mean 8.2 years) with active pulmonary tuberculosis were recruited among the patients at a Pediatric Chest Hospital in Istanbul. Five healthy children (1



Elektrolitler?

Hidroksietil-Nişasta?

# Haemacel®

etken madde: poligelin

- İzo onkotiktir
- Plazmaya yakın viskoziteye sahiptir
- Yarılanma ömrü 4-6 saattir
- AIDS, Hepatit vb. açısından güvenlidir
- Kardiovasküler yüklenme yapmaz
- İç organların fonksiyonunu bozamaz
- Eritrositler üzerine film oluşturmaz
- Hemoztaşı bozmaz
- Mikrosirkülasyon ve diürezisi düzeltir
- Birikme riski taşımaz

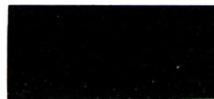
Bozulan  
Fizyolojik  
Dengeyi  
Düzeltilmede  
En Uygun\*  
Seçenek

## Ürün bilgisi:

**Formülü:** 500 ml'de 17,5 g poligelini, katyonlar nımol olarak: Na<sup>+</sup> 72,5, K<sup>+</sup> 2,55, Ca<sup>++</sup> 3,125. Anyonlar : Cl<sup>-</sup> 72,5, eser halinde PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> ve SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> izoiyonik noktaya kadar anyonik polipeptidler. Steril distile su; 500 ml'e kadar. **Endikasyonları:** Hipovolemik şok, kan kaybı, plazma kaybı, cerrahi müdahale sırasında veya sonradan oluşan volüm kayıpları, kalp-akciğer makinasının doldurulması. **Kontrendikasyonları:** İçerdiği maddelere karşı aşırı duyarlık. Haemacel intravasküler ve interstisyel sıvı volümünde artış olan tüm durumlarda gerekli önlem alınarak kullanılmalıdır. **Uyarılar/Önlemler:** Sıtrahlı antikoagülanla muamele edilmiş kan veya plazma Haemacel ile in vitro karıştırılmamalıdır. Haemacel enfüzyonu eritrositlerin sedimantasyon hızında geçici bir artışa yol açabilir. **Yan etkileri:** Haemacel de dahil olmak üzere volüm genişletici etkisi olan solüsyonların enfüzyonu sırasında veya daha sonra deri reaksiyonları, hipotansiyon, ateş yükselmesi, titreme, taşikardi, bradikardi, bulantı-kusma ve dispne görülebilir. Nadir olgularda şoka kadar varabilen ciddi aşırı duyarlık reaksiyonları gözlenmiştir. Bu yan etkiler, histamin açığa çıkaran ilaçların (anestezikler, kas gevşeticiler, analjezikler, ganglion blokerleri, ve anti-kolinerjikler) kümülatif etkisinden dolayı da ortaya çıkabilir. Enfüzyonun hızlı yapılması, histaminden ileri gelen reaksiyonları uyurabilir. **İlaç Etkileşimleri:** Kalp glikozidleri kullananlarda Haemacel'in içeriğindeki kalsiyum ile sinerjik etki ortaya çıkabilir. **Kullanım şekli ve dozu:** Intravenöz enfüzyon şeklinde uygulanır. Enfüzyon hızı ve süresi hastanın durumuna bağlıdır. Enfüzyon hızı sürekli olarak kan basıncına göre ayarlanır. Dakikada damla sayısı: Uygulanacak enfüzyon miktarı (ml) / 4 x Enfüzyon zamanı (saat)

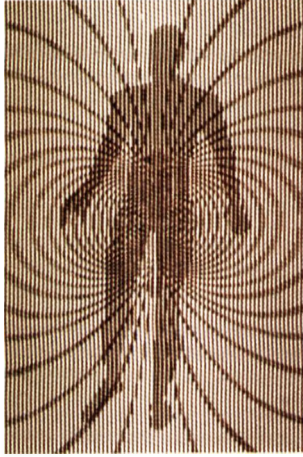
Acil durumlarda volüm eksikliği hızlı veya basınçlı Haemacel enfüzyonuyla karşılanabilir. Basınçlı enfüzyon sadece kontrollü koşullarda yapılmalıdır. **Saklanması:** Haemacel +2 ile +25°C arasında saklanmalı, kutu üzerindeki son kullanma tarihinden sonra kullanılmamalıdır. **Ticari şekli:** 500 ml Haemacel içeren plastik enfüzyon şişesi, enfüzyon seti ile birlikte. **Fiyatı:** 67.100 TL (Şubat 1993). Reçete ile satılır. Ayrıntılı bilgi için firmamıza başvurunuz. Türk Hoechst San. ve Tic. A.Ş. Davutpaşa Cad. No: 145, 34020 Topkapı-İstanbul. Ağustos 1993.

\*Referans: The fluid of choice for resuscitation of severe shock. Smith - JA; Norman - JN, Br - J - Surg. 1982 Dec.

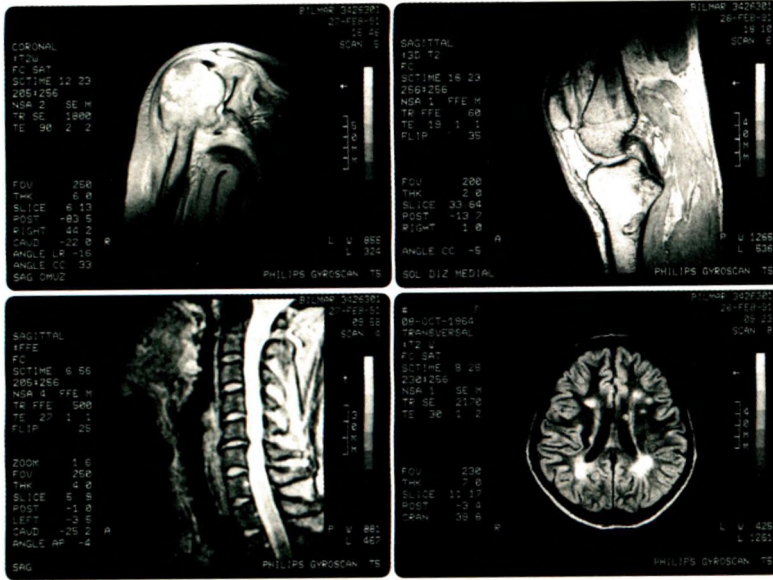


# Hoechst





# BİLMAR



## MANYETİK REZONANS GÖRÜNTÜLEME MERKEZİ

Bağlarbaşı Tophanelioğlu Caddesi No.: 13 B Blok 81140 Altunizade İstanbul  
Telefon 0.212. 341 03 49 - 342 63 01

To higher standarts



**HIPOKRAT**  
**TANI LABORATUVARLARI**

Bağdat Cad. Hasan Amir Sokak No: 2/1-3  
KIZILTOPRAK 81030 | İSTANBUL  
TEL : (216) 418 37 97 - 418 37 98  
FAX : (216) 347 84 96

Sezai Selek Sokak No: 10 Kat : 1  
Nevide Apt. NISANTASI 80200 İSTANBUL  
TEL : (212) 230 91 92 - 230 91 93  
FAX : (212) 230 91 93

Abide-i Hürriyet Caddesi No: 197/2  
ŞİŞLİ 80270 İSTANBUL  
TEL : (212) 233 60 72 - 233 60 73  
FAX : (212) 233 60 73

# HEMODİYALİZ HASTALARINDA RENAL OSTEODİSTROFİNİN ETKİN TEDAVİSİ İÇİN

## Calcijex® (İntravenöz Kalsitriol)

### ÖZELLİKLERİ

- ◆ Calcijex®, yükselmiş PTH düzeylerini düşürür.
- ◆ Calcijex®, hipokalsemi için bir tedavidir.
- ◆ Calcijex® oral olarak değil; IV olarak uygulanır.
- ◆ Calcijex®, IV olarak uygulandığı için daha yüksek kan kalsitriol düzeyleri sağlar.
- ◆ Calcijex® IV olarak uygulandığı için, hasta daha az oral ilaç alır.
- ◆ Calcijex®, diyaliz merkezi personeli tarafından uygulanır.
- ◆ Calcijex® enjeksiyonu hemodiyaliz tedavisi sonunda, venöz kan hattı içinden uygulanır.

### YARARLARI

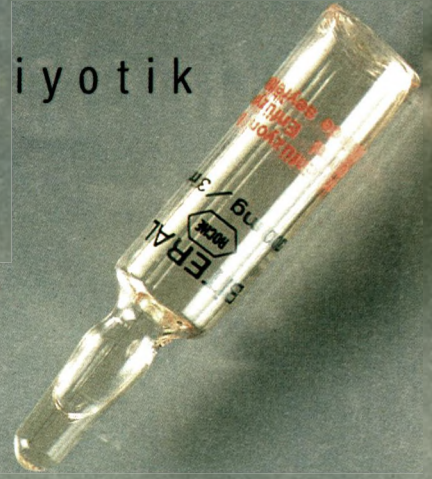
- ◆ Yükselmiş PTH düzeylerini düşürerek sekonder hiperparatiroidizmi medikal olarak düzeltebilir ve renal osteodistrofiyi tedavi edebilirsiniz.
- ◆ Kalsiyumun barsaklardan emilimini artırarak serum kalsiyum düzeylerini yükseltir.
- ◆ İlacın genel dolaşıma katılmasından önce gerçek bir kayıp oluşturabilecek ilk geçiş etkisi yoktur.
- ◆ Kemik, paratiroid bezleri ve barsaklar gibi hedef dokulara direkt etki etmek için, ortamda daha fazla kalsitriol bulunduğu anlamına gelmektedir.
- ◆ Daha iyi hasta uyumu sağlar çünkü hasta ilaç almayı hatırlamak zorunda değildir.
- ◆ Personel hastanın tedavisini kontrol edebilir ve sonuçları dikkatli bir şekilde izleyebilir.
- ◆ Doğrudan hastaya enjeksiyon yapmayı gerektirmez.



## HEMODİYALİZ ZAMANI GELMİŞSE... ...CALCIJEX® ZAMANI DA GELMİŞTİR

**Bileşimi :** Calcijex (Enjeksiyonluk Kalsitriol) sentetik olarak üretilmiş 1 ml'lik 1 mcg veya 2 mcg'lik aktif madde içeren ampul formundadır. **Klinik Farmakoloji :** Kalsitriol, Vitamin D<sub>3</sub>'ün (kolekalsiferol) aktif formudur. Bilinen etki yerleri ince barsak, kemik; böbrek ve paratiroid bezidir. İntestinal kalsiyum transportunun uyarılmasında kalsitriol, D<sub>3</sub> vitamininin bilinen en aktif formudur. PTH ile birlikte, ince barsaktan kalsiyum emilimini uyarır ve kalsiyumun böbrekte tübüler reabsorbsiyonunu artırır. **Endikasyonları :** Kronik diyalize giren hastalarda hipokalsemi tedavisinde endikedir. Artmış olan PTH düzeylerini belirgin bir şekilde düşürdüğü gösterilmiştir. PTH düşüşlerinde, renal osteodistrofide düzelmeye ile sonuçlandırdığı saptanmıştır. **Kontrendikasyonları :** Hiperkalsemi ya da D vitamini toksisitesi belirtileri olan hastalara verilmemelidir. **Kullanım Şekli ve Dozu :** Calcijex'in (Enjeksiyonluk Kalsitriol) optimal dozu her hasta için dikkatle belirlenmelidir. Calcijex tedavisinin etkinliği her hastanın yeterli ve uygun miktarda günlük kalsiyum aldığı varsayımına dayanır. Yetişkinlerde alınması gereken günlük kalsiyum miktarı 800 mg'dir. Her hastanın günlük yeterli kalsiyum alımını garantilemek için hekim ya kalsiyum preparatı vermeli ya da hastaya uygun diyet önerilmelidir. Calcijex'in önerilen başlangıç dozu, haftada üç kez, yaklaşık günün başında uygulanan 0.5 mcg'dir (0.01 mcg/kg). Calcijex, hemodiyaliz sonunda bir kateter aracılığıyla intravenöz bolus doz olarak uygulanabilir. Eğer hastalığın biyokimyasal parametrelerinde ve klinik belirtilerinde tatmin edici bir tepki görülmezse, doz iki-dört hafta aralıklarla 0.25-0.50 mcg artırılabilir. Bu titrasyon döneminde haftada en az iki kez serum kalsiyum ve fosfor düzeyleri saptanmalı ve hiperkalsemi görülürse normokalsemiye erişinceye kadar ilaç kesilmelidir. Hemodiyalizdeki hastaların çoğu haftada üç kez uygulanan 0.5 ve 3.0 mcg (0.01-0.05 mcg/kg) arasındaki dozlara tepki verirler. İlacı kullanmadan önce partikül madde ve renk değişimi açısından görsel olarak inceleyiniz. **Ticari Şekli :** Calcijex (Enjeksiyonluk Kalsitriol) Ruhsat tarihi ve No: Calcijex 1 mcg, 12.10.1994-95/79. Calcijex 2 mcg, 12.10.1994-95/80. Bir kutuda 25 ampul mevcuttur. Ocak 1995 KDV dahil 1 mcg ampul perakende satış fiyatı : 6.148.875 TL. Reçete ile satılır.

Antianaerobik antibiyotik



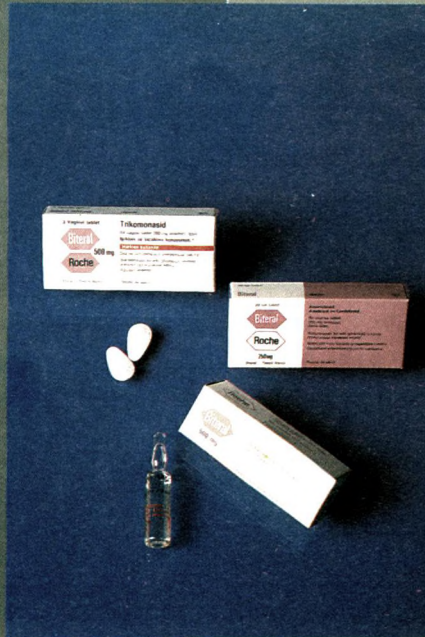
**Biteral® Roche**  
omidazol

## Anaerobik Enfeksiyonların Tedavi ve Profilaksisinde Spesifik Etki

Bacteroides grubuna olduğu gibi, Fusobacterler, anaerob koklar ve Clostridium türlerinin neden olduğu tüm anaerobik enfeksiyonlarda antianaerobik etki sağlar.

**Biteral® Roche**  
Ornidazol

**Bileşimi:** Ornidazol **Endikasyonları:** Anaerob bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların profilaksi ve tedavisi Trichomoniasis, Amebiasis ve Giardiasis tedavisi, **Doz ve Uygulama:** Sabah 500 mg akşam 600 mg 5-10 gün süreyle. **Önlemler:** Değişik türlerde yapılan yaygın çalışmalarda herhangi bir teratojenik veya fetotoksik etki görülmemesine rağmen kesinlikle gerekli değilse ilaç gebeliğin ilk döneminde verilmemelidir. **Kontrendikasyonlar:** İlaça karşı aşırı duyarlılık ve merkezi sinir sistemi hastalığı **Yan Etkiler:** Baş dönmesi, baş ağrısı ve gastrointestinal bozukluklar gibi hafif yan etkiler.



**Ticari Şekli:** 250 mg'lık tablet 20 adet, 500 mg ampul 1 adet, 500 mg vajinal tablet 3 adet.  
**Şubat 1995/KDV Dahil Per.Sat.Fi.**  
Tablet 485.000 TL.,  
Ampul 138.000 TL.,  
Vajinal tablet 186.000 TL.

Reçete ile satılır.

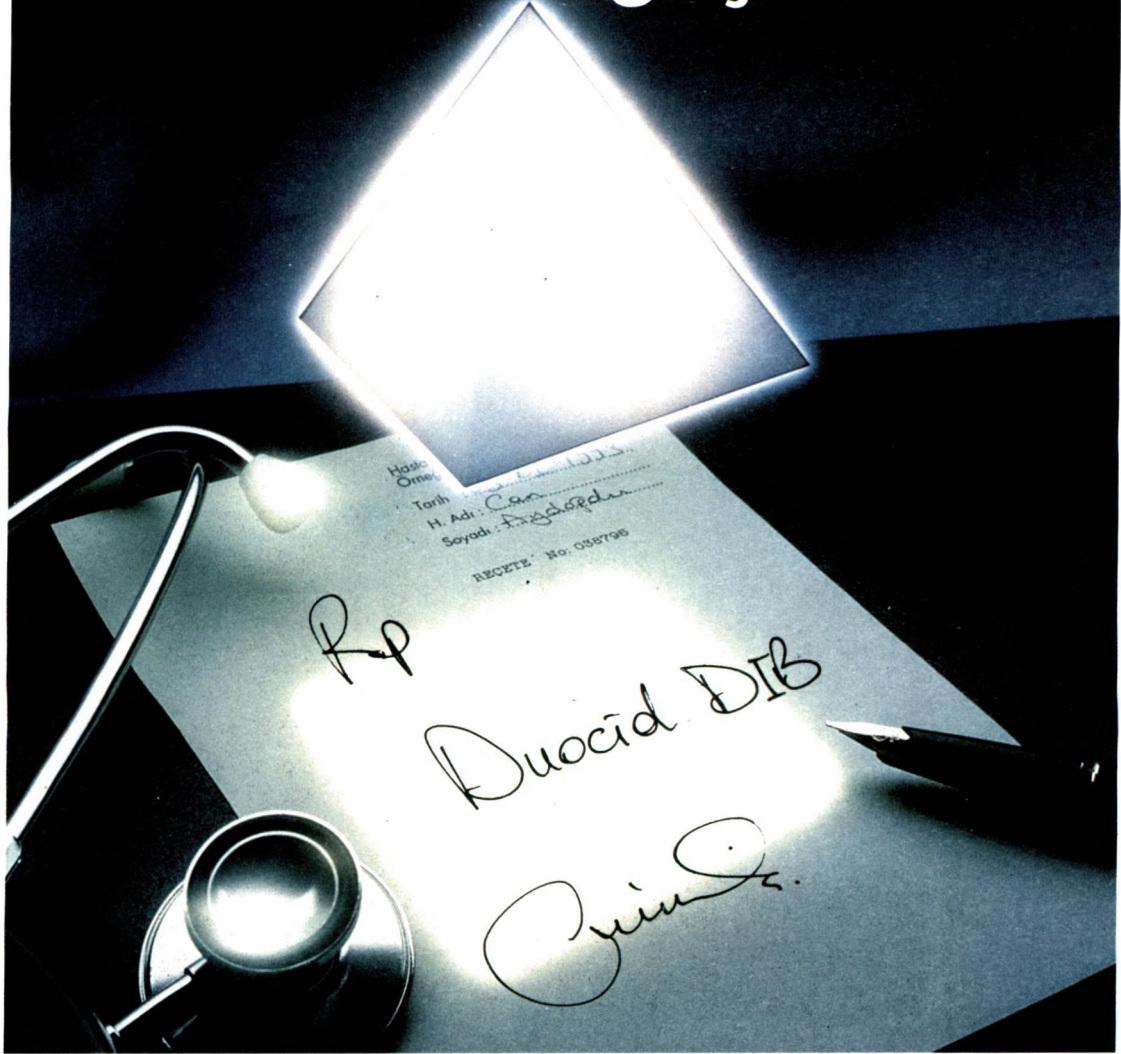
® = tescilli marka  
Daha detaylı bilgi firmamızdan temin edilebilir.

Roche Müstahzarları Sanayi A.Ş.  
P.K.16 - 80622 Levent-İSTANBUL





# Rutin enfeksiyonların tedavisinde güç sizde!



#### Prospektüs Özeti:

**Endikasyonları:** Tablet ve süspansiyon formu üst ve alt solunum yolu enfeksiyonları, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları ve gonorede; enjektabl formları oral formlarına ek olarak intraabdominal enfeksiyonlar, bakteriyel sepsisemi, kemik enfeksiyonlarında kullanılır. **Dozaj:** Oral formların erişkin dozu günde iki defa 375-750 mg'dir. 30 kg'dan hafif çocuklardaki enfeksiyonların çoğunluğunda enfeksiyonun ciddiyetine ve doktorun takdirdine bağlı olarak dozaj iki doza bölmek suretiyle 25-50 mg/kg/gün sultamisilindir. 30 kg'ın üstündeki çocuklara eşşin dozunu verilmelidir. Eşşinlerde enjektabl formları hafif ve orta şiddetli enfeksiyonlarda günde iki kere 0.5-1 g DUOCID® IM/IV, şiddetli enfeksiyonlarda 6-8 saatte bir 1-2 g DUOCID® IM/IV olarak uygulanır. **Önemli:** Her antibiyotik preparatında olduğu gibi, mantarlar dahil duyarlı olmayan organizmaların aşırı üreme belirtileri için devamlı gözlem gereklidir. Süperenfeksiyon olduğunda, ilaç kesilmeli ve/veya uygun tedavi uygulanmalıdır. Uzun süreli tedavilerde, renal, hepatic ve hematopoetik sistemler dahil olmak üzere, organ sistem disfonksiyonu yönünden periyodik kontroller tavsiye edilir. **Yan Etkiler:** Genellikle sultamisilin iyi tolere edilir. Gözlenen yan etkilerin çoğu, hafif ve orta şiddette olup, tedavi süresince normal olarak tahammül edilirler. Gastro-intestinal: Diğer ampisilin sınıflı antibiyotiklerde olduğu gibi, en sık görülen yan etki diyare/yumuşak gaitadır. Bulantı, karn ağrıları/krampları nadiren gözlenmiştir. Epigastrik rahatsızlıklar ve kusma ise enderdir. Deri/Den Yapıları: Den döküntüsü ve kaşıntı seyrek olarak gözlenmiştir. Muhtelif: Sersemlik/sedasyon, yorgunluk/halsizlik ve baş ağrısı seyrek olarak gözlenmiştir. Ampisilin kullanımına bağlı yan etkilerin ara sıra gözlenmesi beklenebilir. **Takdim Şekilleri ve Fiyat:** 375 mg/10 tablet 747.000 TL, 70 ml'lik süspansiyon 767.000 TL, 40 ml'lik pediatrik süspansiyon 403.000 TL, 0.25 g IM/IV ve IM Lidokainli 88.000 TL, 0.5 g IM/IV ve IM Lidokainli 196.500 TL, 1 g IM/IV ve IM Lidokainli 361.000 TL. (Aralık 1994 tarihindeki perakende satış fiyatları esas alınmıştır.)

Ayrıntılı bilgi için firmamıza başvurun.

Pfizer İlaçları A.Ş. 80840 Ortaköy/İSTANBUL Tel: 212 - 260 22 10 (10 hat)

Rutin Enfeksiyonların Antibiyotiği

**DUOCID®**  
(Sulbaktam / Ampisilin-Sultamisilin)





# MARMARA ÜNİVERSİTESİ

## TIP FAKÜLTESİ VAKFI ÖZEL POLİKLİNİĞİ,

*Tüm dertlerinizi paylaşıp, en emin yollarla giderek acılarınızı küçülten, sizi sağlığınıza kavuşturarak mutluluğunuzu büyüten ayrıcalıklı DOST ELLER...*



– Vakfımız Polikliniğinde tüm branşlarda, Klinik hizmeti veren Profesör ve Doçent doktorlarımız uluslararası düzeyde çalışmalarını ile kendilerini kanıtlamışlardır.

– Vakfımız biokimya ve radyoloji laboratuvarında yapılan tetkikler, çeşitli ihtiyaçlara cevap verecek şekilde uygulanan Check-Up programları ile ÇAĞDAŞ, GÜVENİLİR sağlık hizmeti sunmaktadır.

**DOSTLAR NE İÇİN VARDIR?**

male, 4 females, 1-13 years old, mean 5.8 years) and four healthy adults (1 male, 3 females, 30-39 years old, mean 35.2 years) served as controls.

Children with pulmonary tuberculosis were those diagnosed as having characteristic changes on the chest film, positive PPD skin testing and a positive family history. All patients demonstrated significant improvement with anti-TB therapy 3 months later. Five healthy children were selected among children visiting Marmara University Hospital Pediatric Outpatient Clinic for minor complaints and four healthy adults among the staff in the same hospital as controls. They were all tested positive for the tuberculin skin testing and had had BCG vaccination.

## Cell Culture

PBMCs were separated from patients and controls by density gradient centrifugation over Ficoll-Hypaque (Sigma Histopaque D:1077). Cells were washed thrice in RPMI 1640 supplemented with 2% Fetal Calf Serum (FCS) (Gibco, Grand Island, NY). Cells ( $1 \times 10^6$ /ml) were maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, 2 mM/L L-glutamine, 1% Pen-Strep at 37°C and 5%CO<sub>2</sub> atmosphere. Cultures were either unstimulated (medium alone) or were stimulated with PHA (Difco, Detroit, MI). Plates were incubated for 96 hours, either LPS 10 µg/ml or medium was added to each well in the last 24 hours. Supernatants were collected and stored at -70°C until tested.

## Quantitation of TNF- $\alpha$ , sCD8, sIL-2R

TNF- $\alpha$ , sCD8 and sIL-2R levels of PBMC culture supernatants were determined by using a commercially available sandwich ELISA kit (T Cell Sciences, Cambridge, MA) at the Marmara University Pediatric Allergy/Immunology Laboratory.

## Statistics

Data analysis was done by Friedman test and Mann-Whitney U test, as appropriate.

## RESULTS

### TNF- $\alpha$ , Determination

TNF- $\alpha$  production in the PBMC culture supernatant from 8 children with pulmonary TB were measured in response to stimulation with LPS, LPS plus PHA and medium alone (Table I). The median of TNF- $\alpha$  production for unstimulated medium was 42.5 pg/ml (20.0-320.0) in this group. Upon stimulation with LPS only, the median value of TNF- $\alpha$  production was significantly decreased to 15.0 pg/ml (0-90.0)

( $p < 0.05$ ). The stimulation with PHA plus LPS caused a further decrease, with a median of 7.5 pg/ml (0-140.0), which revealed statistically significant difference when compared to unstimulated cells ( $p < 0.01$ ).

TNF- $\alpha$  production in the PBMC supernatants from 5 healthy children and four adults revealed similar results with no statistical difference between them (data not shown). The median of TNF- $\alpha$  production in unstimulated culture for these 9 healthy controls was 15 pg/ml (0-80.0). Upon LPS stimulation it declined to 10.0 pg/ml (0-80). Stimulation with PHA+LPS increased the median of TNF- $\alpha$  production to 30.0 pg/ml (0-70.0). However, there was no statistical difference between these values in this group.

As shown in Figure 1, the medians of TNF- $\alpha$  production of unstimulated PBMCs of children with TB (42.5) and 9 healthy controls (15.0) revealed a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ). However, comparison of the medians of TNF- $\alpha$  between LPS and PHA plus LPS stimulation were not statistically significant in patients and control ( $p > 0.05$ ).

### sIL - 2R Determination

sIL-2R production in the PBMC culture supernatants from 8 children with TB are shown in Table II. The median of sIL-2R in unstimulated culture was 110.0 U/ml (0-185.0) and the stimulation with PHA further increase it to 222.5 U/ml (100.0-415.0) ( $p < 0.05$ ). As shown in Table II, the median of sIL-2R in unstimulated PBMC culture supernatant in 9 healthy controls was 105.0 U/ml (35.0 - 295.0). Upon stimulation with PHA, it became 430.0 U/ml (210.0 - 600.000) ( $p < 0.05$ ). However, there was no statistically significant difference between the medians of sIL-2R in children with pulmonary TB and controls either in unstimulated or PHA stimulated cells.

### sCD8 Determination

Measurements of sCD8 levels in the supernatant of PBMC culture for all subjects are shown in Table II. The median of sCD8 in unstimulated culture in 8 children with TB was 137.5 U/ml (0-700.0). After stimulation with PHA, it increased to 355.0 U/ml (180.0-460.0) ( $p = 0.05$ ). The median of sCD8 in unstimulated culture in 9 healthy controls was 180.0 U/ml (0-240.0), which increased to 385.0 U/ml (180.0 - 560.0) upon stimulation with PHA, and showed statistical significance ( $p < 0.05$ ).

However, the comparison of the medians of sCD8 either in supernates of unstimulated or PHA stimulated cells of children with TB and controls revealed no significant difference ( $p > 0.05$ ).

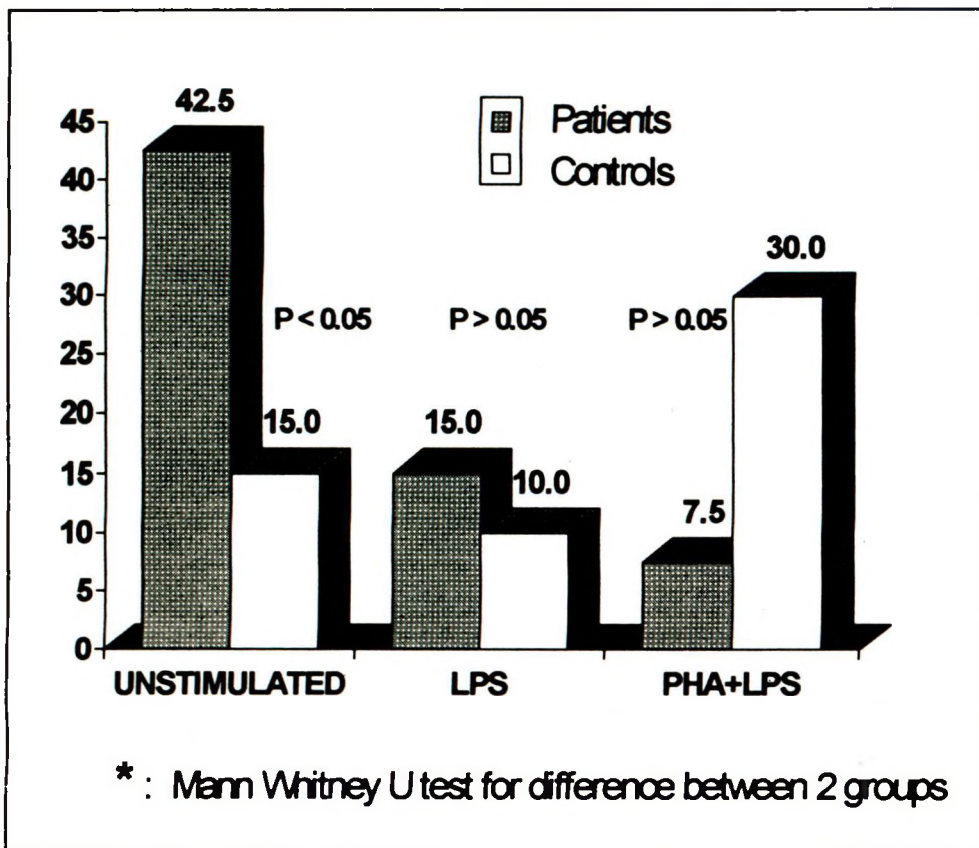
**Table I:** The median of TNF- $\alpha$  determinations (pg/ml) in PBMC culture supernatants of children with tuberculosis and controls.

	Control n=9	Patients n=8		
Unstimulated	15.0 (0-80.0)***	42.5 (20.0-320.0)	] p*	] p**
LPS	10.0 (0-90.0)	15.0 (0-90.0)		
PHA+LPS	30.0 (0-70.0)	7.5 (0-140.0)		

\* : p<0.05  
 \*\* : p<0.01  
 \*\*\* : min. - max. values

**Table II:** The medians of sIL2R and sCD8 determinations (U/ml) in PBMC culture supernatants of children with tuberculosis and controls

	sIL2R			sCD8		
	Unstimulated	PHA	p	Unstimulated	PHA	p
Patients (n=8)	110.0 (0-185.0)	222.5 (100.0-415.0)	<0.05	137.5 (0-700.0)	355.0 (180.0-460.0)	= 0.05
Controls (n=9)	105.0 (35.0 - 295.0)	430.0 (210.0-600.0)	<0.05	180.0 (0-240.0)	385.0 (180.0-560.0)	<0.05



**Fig. 1:**  
 TNF- $\alpha$  production in  
 PBMC culture  
 supernatants of  
 children with TB and  
 healthy controls.

## DISCUSSION

Our findings showed that PBMC from children with TB spontaneously secrete significantly higher levels of TNF- $\alpha$  than PBMC obtained from healthy controls. Furthermore, there was a significant decline in the amount of TNF- $\alpha$  upon addition of LPS to the medium.

TNF- $\alpha$  is known to be secreted mainly from monocyte/macrophages in response to mycobacterial antigens. Rook et al has shown that TNF- $\alpha$  may be implicated in the protective immunity against tuberculosis by promoting activation of mycobactericidal mechanisms in human macrophages as well as immunopathologic changes such as granuloma formation and tissue destruction (1). It was demonstrated by Wright et al that cultured PBMCs from AIDS patients spontaneously released high levels of TNF- $\alpha$  when compared to controls and suggested that it may be related to *in vivo* activation of macrophages (2). Recently, a markedly elevated TNF- $\alpha$  concentrations in *M. tuberculosis* reactive human T cell clone supernatants was shown in humans (5). Our results suggest that there is increased *in vitro* spontaneous TNF- $\alpha$  production by PBMC of children with TB. This might be due to *in vivo* activation of monocyte/macrophages upon stimulation with *M. tuberculosis*.

Data from Flick DA et al revealed that TNF- $\alpha$  appeared shortly after LPS administration to the mice (6). When such animals were reinjected with LPS, they were unresponsive (tolerated) and did not produce TNF- $\alpha$  again, at least for seven days. In our culture conditions, LPS did not cause a significant increase of TNF- $\alpha$  production from PHA primed PBMCs of healthy controls. However, we detected a marked decline of TNF- $\alpha$  secretion in patients' cultures with LPS, implicating *in vitro* toleration of TNF- $\alpha$  secreting cells which had been already stimulated by *M. tuberculosis* *in vivo*. Evidence is increasing that cytolytic mechanisms contribute to protection against mycobacteria and requirement for both CD4+ and CD8+ T cells has been suggested

(3). Previously it has been shown that CD8+ cells release a soluble form of the CD8+ antigen which may be of value in monitoring the involvement of these cells in response to a stimulus. The present results demonstrated that both children with TB and the healthy controls responded by increasing sCD8 upon PHA stimulation *in vitro*. However, there was no significant difference between these two groups.

Kaufmann et al demonstrated that *M. tuberculosis* - activated T lymphocytes express IL-2R and secrete IL-2 (4). IL2R is shed after stimulation of mononuclear cells by IL-2 and possibly plays a regulatory role in the immune response. Although we observed an increase in sIL-2R levels in PBMC supernatants of both in children with TB and healthy controls, there was no significant difference between the groups.

We concluded that PBMC obtained from children with TB spontaneously secreted high levels of TNF- $\alpha$ , whereas further stimulation with LPS may down regulate or tolerate it. The significance of this finding remains to be elucidated.

## REFERENCES

1. Rook GAW, Al Attiyah R, Foley N. The role of cytokines in the immunopathology of tuberculosis, and the regulation of agalactosyl IgG. *Lymphokine Res* 1989;8:323-328.
2. Wright SC, Jewett A, Mitsuyasu R, Bonovida B. Spontaneous cytotoxicity and tumor necrosis factor production by peripheral blood monocytes from AIDS patients. *J Immunol* 1988;141:99-104.
3. Guliera I, Mukherjee R, Kaufmann SH. *In-vivo* depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes impairs *Mycobacterium* vaccine-induced protection against *M. tuberculosis* in mice. *Med Microbiol Immunol* 1993;182:129-135.
4. Hunk ME, Gatrill AJ, Kaufmann S. Target cell lysis and IL-2 secretion by g/d T lymphocytes after activation with bacteria. *J Immunol* 1990;145:2434-2439.
5. Barnes PF, Abrams JS, Lu S, Sieling PA, Rea TH, Modlin RL. Patterns of cytokine production by mycobacterium-reactive human T-cell clones. *Infect Immun* 1993;61:197-203.
6. Flick DA, Gifford GE. Production of TNF in unprimed mice mechanism of endotoxin-mediated tumor necrosis. *Immunobiology* 1986;171:320-328.