

ВЛИЯНИЕ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ НА СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ БРУЦЕЛЛЕЗОМ

Н.И. Ковалевич¹, Н.С. Саркисян¹, Е.Л. Ракитина¹, В.А. Галяс¹, И.В. Санникова²,
О.В. Махиня²

¹ ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

² ГБОУ ВПО Ставропольский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Ставрополь, Россия

Резюме. Цель исследования состояла в определении уровня провоспалительных цитокинов: IL-12, IL-8 и IFN γ , неоптерина и липополисахарид-связывающего белка в сыворотке крови больных острым бруцеллезом до и после проведения антибактериальной терапии. Объектом исследования послужил клинический материал от 32 пациентов с лабораторно подтвержденным диагнозом «Острый бруцеллез», поступивших в отделение по диагностике, лечению и экспертизе профпатологии бруцеллеза ГБУЗ СК «Городская клиническая больница № 2» г. Ставрополя. Концентрации цитокинов IL-12, IL-8, IFN γ и острофазных белков определяли в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа. В острую фазу бруцеллезной инфекции (до лечения) отмечался высокий уровень провоспалительных цитокинов IL-8 и IFN γ , но несмотря на проведенный курс антибиотикотерапии в сыворотке крови больных сохранился высокий уровень IL-8, свидетельствующий о активном воспалении при отсутствии клинических проявлений. Уровень IL-12, ключевого цитокина в инициации лимфоцит-зависимого иммунного ответа, был ниже, чем в контрольной группе. Оценка цитокинового статуса (IL-8, IL-12, IL-18) и белков острой фазы воспаления (неоптерина и липополисахарид-связывающего белка) позволила получить ценную информацию для мониторинга эффекта фармакотерапии острого бруцеллеза. Показатели уровня липополисахарид-связывающего белка и неоптерина в сыворотке больных бруцеллезом следует рассматривать как маркер активности воспалительного процесса и как предиктор исходов острого бруцеллеза.

Ключевые слова: бруцеллез, цитокины, белки острой фазы воспаления, иммунный ответ, диагностика, иммунопатогенез.

THE INFLUENCE OF PATHOGENETIC THERAPY ON THE LEVER OF CYTOKINES IN PATIENTS WITH ACUTE BRUCELLOSIS

Kovalevich N.I.^a, Sarkisyan N.S.^a, Rakitina E.L.^a, Galyas V.A.^a, Sannikova I.V.^b, Makhinya O.V.^b

^a Federal Governmental Health Agency Stavropol anti Plague Institute of Rosпотребнадзор, Stavropol, Russian Federation

^b Stavropol State Medical University, Stavropol, Russian Federation

Abstract. The purpose of the study was to determine the level of proinflammatory cytokines: IL-12, IL-8 and IFN γ , neopterin and lipopolysaccharide-binding protein in the serum of patients with acute brucellosis before and after antibiotic therapy. The clinical data from 32 patients with laboratory-confirmed diagnosis — “acute brucellosis” admitted

Адрес для переписки:

Саркисян Нушик Сааковна
355035, Россия, г. Ставрополь, ул. Советская, 13-15,
Ставропольский противочумный институт.
Тел.: 8 (4967) 36-00-03.
E-mail: nyshik@yandex.ru

Contacts:

Nyshik S. Sarkisyan
355035, Russian Federation, Stavropol, Sovetskaya str., 13-15,
Stavropol anti Plague Institute.
Phone: +7 (4967) 36-00-03.
E-mail: nyshik@yandex.ru

Библиографическое описание:

Ковалевич Н.И., Саркисян Н.С., Ракитина Е.Л., Галяс В.А., Санникова И.В., Махиня О.В. Влияние патогенетической терапии на содержание цитокинов у больных острым бруцеллезом // Инфекция и иммунитет. 2016. Т. 6, № 4. С. 384–388.
doi: 10.15789/2220-7619-2016-4-384-388

© Ковалевич Н.И. и соавт., 2016

Citation:

Kovalevich N.I., Sarkisyan N.S., Rakitina E.L., Galyas V.A., Sannikova I.V., Makhinya O.V. The influence of pathogenetic therapy on the lever of cytokines in patients with acute brucellosis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2016, vol. 6, no. 4, pp. 384–388.
doi: 10.15789/2220-7619-2016-4-384-388

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2016-4-384-388>

to the diagnosis, treatment and examination of occupational diseases brucellosis GBUZ SC "City Clinical Hospital No. 2", the city of Stavropol were used in the study. The concentrations IL-12, IL-8, IFN γ cytokines and acute-phase proteins in serum was determined by ELISA. In the acute phase of brucellosis infection (before treatment) had high levels of pro-inflammatory cytokines IL-8 and IFN γ , but despite holding a course of antibiotic treatment in the serum of patients with preserved high levels of IL-8, indicative of active inflammation in the absence of clinical manifestations. IL-12 level, a key cytokine in the initiation of lymphocyte-dependent immune response was lower than in the control group. Evaluation of the cytokine status (IL-8, IL-12, IL-18) and proteins of acute inflammation phase (neopterin and lipopolysaccharide-binding protein) will provide valuable information for monitoring the effect of pharmacotherapy of acute brucellosis. Indicators of lipopolysaccharide-binding protein and neopterin in the serum of patients with brucellosis should be considered as a marker of inflammatory activity and as a predictor of outcome of acute brucellosis.

Key words: *brucellosis, cytokines, acute phase proteins of inflammation, immune responses, diagnostics, immunopathogenesis.*

В Северо-Кавказском и Южном федеральных округах наблюдается напряженная эпидемическая ситуация по бруцеллезу [3]. Бруцеллез является широко распространенным инфекционно-аллергическим заболеванием с длительной персистенцией возбудителя и стертой клинической картиной. Существующие методы диагностики и прогноза течения заболевания имеют ряд недостатков, поэтому актуальной задачей является поиск надежных, малоинвазивных методов выявления биомаркеров крови. В качестве биомаркеров могут выступать цитокины — медиаторы хронического воспаления, непосредственно участвующие в иммунопатогенезе бруцеллеза.

Патогенетической основой практически закономерной трансформации острой стадии инфекции в хроническую является несостоятельность врожденного и адаптивного иммунитета в отношении бруцелл с созданием условий для незавершенного фагоцитоза и долгосрочного внутриклеточного паразитирования [2, 3, 5, 6, 7, 10]. Известно, что в комбинированном иммунодефиците при бруцеллезе ключевая роль принадлежит клеточному иммунитету и дисбалансу Th1, про- и противовоспалительных цитокинов, а также интерферонов (IFN), прежде всего IFN γ , необходимых для элиминации возбудителя [1, 8]. Адекватный клеточный иммунный ответ (Th1) имеет решающее значение для обезвреживания бруцелл. Элиминация возбудителя обусловлена продукцией цитокинов Th1. Установлено, что при бруцеллезной инфекции ключевым цитокином в формировании ответной воспалительной реакции IFN γ , продуцентами которого являются активированные Т-лимфоциты и естественные киллеры, а индуктором синтеза является интерлейкин-12 (IL-12). Дисбаланс субпопуляций Th1 и цитокинов, продуцируемых ими, ассоциируется с длительной персистенцией бруцелл в организме человека и исходом инфекции (выздоровление или рецидив).

Изучение уровня специфических острофазовых показателей неоптерина и липополисахарид-связывающего белка (ЛПС-белок) в корреляции с комплексом провоспалительных цитокинов (IL-8, IL-12, IL-18) в сыворотке крови позволит расширить представления о патогенезе бруцеллеза.

Так, ЛПС-белок относится к белкам острой фазы и синтезируется в клетках печени, легких и энтероцитах под действием IL-1, IL-6 [1]. Этот белок играет центральную роль в ответ на попадание липополисахарида (ЛПС) грамотрицательных бактерий путем прочного их связывания. ЛПС-белок катализирует перенос ЛПС грамотрицательных бактерий на CD14-рецептор белок экспрессированный на поверхности макрофагов и распознающий ЛПС. В результате чего происходит запуск каскада реакций, приводящих в конечном итоге к активации основных клеточных функций, связанных с развитием фагоцитоза и синтезом провоспалительных цитокинов IL-12, IL-18 [10].

Одним из серологических маркеров активации Th1-типа иммунного ответа является неоптерин, представляющий собой метаболит нуклеиновых оснований, схожий по структуре с молекулой фолиевой кислоты [4]. Он образуется в активированных моноцитах и макрофагах из гуанозинтрифосфата. Основным индуктором его синтеза является IFN γ , при этом другие Th1 провоспалительные цитокины (TNF α и IL-2) резко усиливают стимулированную IFN γ выработку неоптерина [9]. Это дает основание рассматривать неоптерин в качестве интегрального показателя цитокинзависимой активации моноцитов/макрофагов [6].

Целью исследования явилось определение уровня провоспалительных цитокинов: IL-12, IL-8 и IFN γ , неоптерина и липополисахарид-связывающего белка в сыворотке крови больных острым бруцеллезом до и после проведения антибактериальной терапии.

Материалы и методы

Объектом исследования послужил клинический материал от 32 пациентов с лабораторно подтвержденным диагнозом «Острый бруцеллез», поступивших в отделение по диагностике, лечению и экспертизе профпатологии бруцеллеза ГБУЗ СК «Городская клиническая больница № 2», г. Ставрополя. Диагноз бруцеллеза устанавливался на основании данных эпидемиологических, клинических и лабораторных исследований. Группу сравнения составили здоровые люди ($n = 20$), сопоставимые по полу и возрасту с больными бруцеллезом, не болевшие бруцеллезом и не вакцинированные против этой инфекции.

Методом твердофазного иммуноферментного анализа было проведено определение уровня IL-12, IL-8 в сыворотке крови с использованием тест-систем Flow Cytomix Simplex Kit («Bender MedSystems GmbH», Австрия). IFN γ в сыворотке крови исследовали с помощью тест-системы А-8752 «гамма-Интерферон-ИФА-БЕСТ», Россия. Определение уровня неоптерина выполняли с использованием тест-систем Neopterin ELISA «IBL, Hamburg». Липополисахарид-связывающий белок определяли тест-системой Human LBP, ELISA. Определение изучаемых показателей проводили до и после проведения курса антибиотикотерапии. Терапия проводилась в течение 6 недель, в схеме доксициклин и рифампицин.

Обеззараживание исследуемого материала осуществляли в соответствии СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)».

Для статистического анализа использовали T-критерий Уилкоксона (до и после лечения) и t-критерий Стьюдента для несвязанных совокупностей (сравнение с группой здоровых). Уровень достоверности принимали равным $p < 0,05$. В качестве критериев активности воспаления использовали рутинные лабораторные тесты: уровень лейкоцитов, скорость оседания эритроцитов (СОЭ), острофазный белок — С-реактивный белок (СРБ).

Результаты и обсуждение

В ходе проведенного исследования установлено, что у больных острым бруцеллезом до приема антибиотикотерапии уровень IL-12 составил $25,66 \pm 0,72$ пг/мл, что ниже ($p < 0,05$) показателя в группе здоровых людей ($31,75 \pm 0,72$ пг/мл). После лечения уровень IL-12 не изменился ($25,87 \pm 0,89$ пг/мл; $p > 0,05$). Уровень IL-8 до лечения значительно ($p < 0,05$) превысил показатель в контрольной группе ($4,33 \pm 0,8$ пг/мл) и составил $8,66 \pm 0,59$ пг/мл. После лечения антибиотиками уровень IL-8 оставался высоким ($8,76 \pm 0,96$ пг/мл), не отличаясь от исходного ($p > 0,05$). Показатели IFN γ в сыворотке крови больных до проведения терапии значительно превышали показатели в контрольной группе ($3,35 \pm 0,6$ пг/мл), составляя $18,22 \pm 5,03$ пг/мл ($p < 0,05$). После завершения курса антибактериальной терапии значения были в пределах референсных (допустимых значений) ($7,19 \pm 3,03$ пг/мл; $p > 0,05$).

У больных острым бруцеллезом до лечения антибиотиками показатель липополисахарид-связывающего белка составил $52,2 \pm 0,77$ пг/мл,

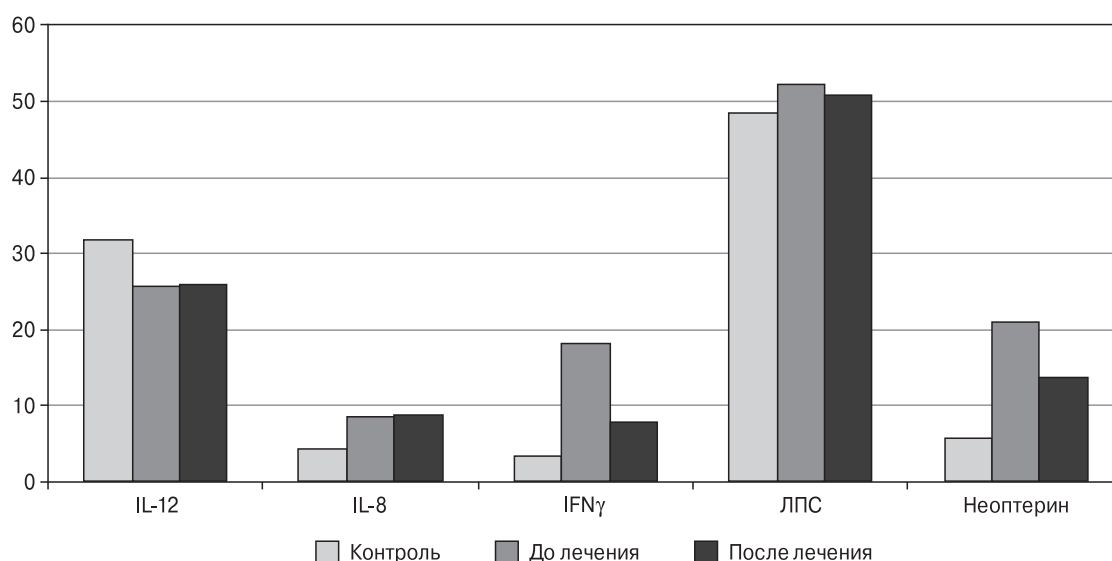


Рисунок. Сравнительные значения провоспалительных цитокинов и острофазовых показателей воспалительного процесса при остром бруцеллезе

($p < 0,05$), а после курса антибиотикотерапии — $50,79 \pm 0,78$ пг/мл. Уровень неоптерина в сыворотке крови больных бруцеллезом до начала специфической терапии составил $21,01 \pm 3,6$ нмоль/л, что значительно выше в сравнении с группой контроля ($5,7 \pm 0,54$ нмоль/л; $p < 0,05$). После окончания курса антибиотикотерапии уровень неоптерина снизился до $13,69 \pm 3,39$ нмоль/л, что ниже в сравнении с его уровнем до лечения ($p < 0,05$), но выше чем у здоровых людей ($p < 0,05$). Общее количество лейкоцитов в периферической крови оставалось в пределах нормальных значений ($4,0-9,0 \times 10^9$ /л) независимо от лечения. Уровень СОЭ до лечения составил $20,91 \pm 1,94$ мм/ч, что выше в сравнении со значениями в контрольной группе ($p < 0,05$), а после антибактериальной терапии показатели были в пределах нормы ($11,66 \pm 1,75$ мм/ч). Уровень С-реактивного белка в сыворотке крови только у части больных (12,5%) до лечения превышал нормальные значения, средний уровень составил $15,63 \pm 3,05$, что не превышало значения нормы. Данные о провоспалительных цитокинах и острофазовых показателях представлены на рисунке.

В острую фазу бруцеллезной инфекции (до лечения) отмечается высокий уровень провоспалительных цитокинов IL-8 и IFN γ (рис.). Несмотря на проведенный курс антибиотикотерапии, в сыворотке крови больных сохраняется высокий уровень IL-8, свидетельствующий об активном воспалении при отсутствии клинических проявлений. В сыворотке крови больных острым бруцеллезом уровень IL-12 — ключевого цитокина в инициации лимфоцит-зависимого иммунного ответа — был ниже, чем в контрольной группе. Селективная ингибция синтеза

IL-12 при сохранении продукции других провоспалительных цитокинов (IL-8, IFN γ), вероятно, является одним из факторов длительной персистенции бруцелл в организме хозяина. Показатели уровня ЛПС-белка и неоптерина в сыворотке больных бруцеллезом следует рассматривать как маркер активности воспалительного процесса и как предиктор исходов острого бруцеллеза.

Таким образом, в развитии и течении бруцеллеза важная роль принадлежит цитокинам. С их помощью реализуется широкое взаимодействие на субклеточном, клеточном, органном, системном уровнях, формирование комплексной защитной реакции, направленной на нейтрализацию патогенных агентов, их разрушение, элиминацию из организма, сохранение его структурной и функциональной целостности. В организме цитокины тесно взаимодействуют между собой, образуют универсальную коммуникационную биологическую сеть, запускающую и регулирующую целый каскад воспалительных, иммунных, метаболических процессов. Провоспалительные цитокины усиливают воспаление, явления альтерации, деструкции, стимулируют синтез острофазных белков. Продолжительный, повышенный синтез цитокинов может стать фактором прогрессирования патологического процесса, оказывая прямое повреждающее действие на клетки и ткани, индуцируя альтерацию, нарушение целостности сосудистой стенки, усиление и хронизацию воспалительного процесса.

Комплексная оценка цитокинового статуса (IL-8, IL-12, IL-18) и белков острой фазы воспаления (неоптерина и ЛПС-белка) позволяет получить ценную информацию для мониторинга эффекта терапии острого бруцеллеза.

Список литературы/References

1. Жумадилова З.К., Байсугуров Ж.Б. Ферментные системы фагоцитирующих мононуклеаров при различных вариантах течения бруцеллеза // Здравоохранение Казахстана. 1989. № 6. С. 29–31. [Zhumadilova Z.K., Baysugurov J.B. Mononuclear phagocyte enzyme system in different variants of flow of brucellosis. *Zdravookhranenie Kazakhstana = Healthcare in Kazakhstan*, 1989, no. 6, pp. 29–31 (In Russ.)]
2. Инфекционные болезни: национальное руководство / под ред. Н.Д. Ющука, Ю.Я. Венгерова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 1040 с. [Infektsionnye bolezni: natsional'noe rukovodstvo / pod red. N.D. Yushchuka, Yu.Ya. Vengerova [Infectious diseases: national guideline. Eds. N.D. Yushchuk, U.Yu. Vengerov]. Moscow: GEOTAR-Media, 2009. 1040 p.]
3. Лямкин Г.И., Пономаренко Д.Г., Худолеев А.А., Вилинская С.В., Зайцев А.А., Куличенко А.Н. Эпидемиологическая ситуация по бруцеллезу в Российской Федерации и государствах — участниках Содружества Независимых Государств // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2016. № 1. С. 68–74. [Lyamkin G.I., Ponomarenko D.G., Khudoleev A.A., Vilinskaya S.V., Zaitsev A.A., Kulichenko A.N. Epidemiological situation on brucellosis in the Russian Federation and the states — participants of the Commonwealth of Independent States. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie = Infectious Diseases: News, Opinions, Training*, 2016, no. 1, pp. 68–74. (In Russ.)]
4. 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. [Sviridov E.A., Telegina T.A. Neopterin and its reduced forms: biological role and participation in cellular immunity. *Uspekhi biologicheskoy khimii = Advances in Biochemistry*, 2005, vol. 45, pp. 355–390. (In Russ.)]
5. Ariza J., Corredora J., Pallares R., Viladrich P.F., Rufi G., Pujol M., Gudiol F. Characteristics of and risk factors for relapse of brucellosis in humans. *Clin. Infect. Dis.*, 1995, vol. 20, pp. 1241–1249. doi: 10.1093/clinids/20.5.1241
6. Boschiroli M.L., Foulongne V., Callaghan D.O. Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2001, vol. 4, pp. 58–64. doi: 10.1016/S1369-5274(00)00165-X

7. Liautard J.P., Gross A., Dornand J., Köhler S. Interactions between professional phagocytes and *Brucella* spp. *Microbiologia*, 1996, vol. 12 (2), pp. 197–206.
8. Mantur B.G., Amarnath S.K., Shinde R.S. Review of clinical and laboratory features of human brucellosis. *J. Indian Med. Microbiol.*, 2007, vol. 25 (3), pp. 188–202. doi: 10.4103/0255-0857.34758
9. Ocon P., Reguera J.M., Morata P., Juarez C., Alonso A., Colmenero J.D. Phagocytic cell function in active brucellosis. *Infect. Immun.*, 1994, vol. 62, pp. 910–914.
10. Skendros P., Pappas G., Boura P. Cell-mediated immunity in human brucellosis. *Microbes Infect.*, 2011, vol. 13 (2), pp. 134–142. doi: 10.1016/j.micinf.2010.10.015

Авторы:

Ковалевич Н.И., к.м.н., зав. научно-профилактической клинико-диагностической лабораторией ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия;

Саркисян Н.С., врач клинической лабораторной диагностики научно-профилактической клинико-диагностической лаборатории ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия;

Ракитина Е.Л., к.м.н., ведущий научный сотрудник сектора иммунологии и патоморфологии особо опасных инфекций лаборатории бруцеллеза ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия;

Галяс В.А., врач клинической лабораторной диагностики научно-профилактической клинико-диагностической лаборатории ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия;

Санникова И.В., д.м.н., профессор кафедры инфекционных болезней и фтизиатрии ГБОУ ВПО Ставропольский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Ставрополь, Россия;

Махиня О.В., аспирант кафедры инфекционных болезней и фтизиатрии ГБОУ ВПО Ставропольский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Ставрополь, Россия.

Authors:

Kovalevich N.I., PhD (Medicine), Head of the Research and Prevention Clinical Diagnostic Laboratory, Stavropol Antiplague Institute, Stavropol, Russian Federation;

Sarkisyan N.S., Physician of Clinical Laboratory Diagnostics, Research and Prevention Clinical Diagnostic Laboratory, Stavropol Antiplague Institute, Stavropol, Russian Federation;

Rakitina E.L., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Bruzellosis, Sector of Immunology and Pathomorphology of Especially Dangerous Infections, Stavropol Antiplague Institute, Stavropol, Russian Federation;

Galyas V.A., Physician of Clinical Laboratory Diagnostics, Research and Prevention Clinical Diagnostic Laboratory, Stavropol Antiplague Institute, Stavropol, Russian Federation;

Sannikova I.V., PhD, MD (Medicine), Professor of the Department of Infectious Diseases and Phthisiatry, Stavropol State Medical University, Stavropol, Russian Federation;

Makhinya O.V., PhD Candidate, Department of Infectious Diseases and Phthisiatry, Stavropol State Medical University, Stavropol, Russian Federation.