

СОДЕРЖАНИЕ IL-1 β , IL-1Ra, IL-4, IL-8 И IFN γ У ДЕТЕЙ С МАЛЫМИ ФОРМАМИ ТУБЕРКУЛЕЗА, ИНФИЦИРОВАННЫХ ТОКСОПЛАЗМАМИ И ВИРУСОМ ЭПШТЕЙНА–БАРР

Калитин А.В., Долгих Т.И.

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования
«Омская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению
и социальному развитию», г. Омск

Резюме. С целью оценки состояния цитокиновой системы у детей с малыми формами туберкулеза, инфицированных *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) и *Epstein–Barr virus* (EBV), обследовано 122 ребенка в возрасте от 7 до 16 лет. Методом ИФА исследована кровь на наличие IgM, IgA, IgG к *T. gondii* и EBV и цитокинов IL-1 β , IL-1Ra, IL-4, IL-8 и IFN γ . Сформированы три группы: I – дети с IgG к *T. gondii*, II – дети с IgM или IgA к *T. gondii* (активное течение токсоплазмоза), III – дети, имевшие *T. gondii*-IgA и EBV-IgG-EA (активное течение токсоплазмоза и EBV-инфекции). Группу сравнения (IV) составили тубинфицированные дети, серонегативные к *T. gondii* и не имевшие EBV-IgG-EA. Контрольная группа – 30 практически здоровых лиц. Установлено параллельное и значительное по сравнению с контролем увеличение содержания IL-4 и спонтанного IFN γ в I–III группах, но только в III группе отмечалась сниженная в 4 раза по отношению к IV группе продукция IL-1 β и в 5,5 раза (в сравнении с контролем) продукция стимулированного IFN γ . Установлена неадекватная гиперпродукция IL-1 β и низкий уровень IL-1Ra в I, II и IV группах. В III группе отмечено снижение IL-1Ra в 3,4 раза и в 5,5 раза по сравнению с IV группой и контролем соответственно. Содержание IL-8 в I–III группах достоверно превышало контроль в 2,9–3 раза с более высокими показателями во II группе. Таким образом, не исключено прямое ингибирующее действия EBV на клеточный иммунитет в условиях тубинфицирования и активно протекающего токсоплазмоза, что усугубляет иммунную дисфункцию.

Ключевые слова: цитокины, токсоплазмоз, вирус Эпштейна–Барр, туберкулез.

Kalitin A.V., Dolgikh T.I.

CONTENTS OF IL-1 β , IL-1Ra, IL-4, IL-8 AND IFN γ IN THE CHILDREN WITH MINOR CLINICAL FORMS OF TUBERCULOSIS INFECTED WITH *TOXOPLASMA GONDII* AND *EPSTEIN–BARR VIRUS*

Abstract. A group of 122 children, aged 7 to 16 year, with minor clinical forms of tuberculosis and infected with *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) and *Epstein–Barr virus* (EBV) was examined to evaluate the cytokine system. Immunoenzyme techniques were used to detect the presence IgM, IgA, IgG to *T. gondii* and EBV, as well as IL-1 β , IL-1Ra, IL-4, IL-8, and IFN γ cytokines in blood. The patients were classified into three groups: (I) children with IgG to *T. gondii*, (II) children with IgM or IgA to *T. gondii* (active toxoplasmosis), (III) children with *T. gondii*-specific IgA and EBV-IgG-EA (active course of both toxoplasmosis and EBV infection). A comparison group (IV) consisted of TB-infected, *T. gondii*-seronegative patients without EBV-IgG-EA. A control group included thirty persons without evident disease. In groups I–III, a simultaneous and significant increase in IL-4 and spontaneous IFN γ contents was found, in comparison with controls. In group III, however, a 4-fold depression in IL-1 β production was revealed against group IV, along with a 5.5-fold stimulation IFN γ

Адрес для переписки:

644001, г. Омск, ул. 20 лет РККА, 15, ЦНИЛ ОмГМА.

Тел.: 8 (3812) 37-03-43.

Факс: 8 (3812) 36-17-90.

E-mail: dolgih-ti@mail.ru

production (as compared with controls). In groups I, II, IV, an inadequate hyperproduction of IL-1 β and low IL-1Ra levels were shown. In the group III, a 3.4-fold and 5.5 fold IL-1Ra decrease were found, as compared, respectively, with group IV and control group. IL-8 content in groups I to III significantly exceeded control values (a 2.9 to 3-fold increase, with higher rates in group II). Hence, a direct inhibitory effect of EBV upon cell-mediated immunity should not be excluded under the conditions of TB-infection and active toxoplasmosis, thus further aggravating the immune dysfunction. (*Med. Immunol.*, 2008, vol. 10, N 2-3, pp 273-276)

Введение

Несмотря на многочисленные исследования в области иммунопатогенеза, диагностики и лечения токсоплазмоза, эту проблему нельзя считать до конца решенной [1, 2, 9]. Особую значимость эта проблема приобретает на фоне роста иммунодефицитных состояний и оппортунистических инфекций, возникающих на фоне нарушений в иммунной системе, среди которых токсоплазмозу отводится важная роль как одной из причин в формировании акушерской и детской патологии [2, 4, 5], особенно у иммунокомпрометированных лиц [13].

Известно, что в организме с хорошей иммунорезистентностью токсоплазмоз редко дает типичные манифестные формы: в 95-99% это заболевание протекает бессимптомно и остается недиагностированным ввиду отсутствия патогномичных признаков [6]. Трудности диагностики токсоплазмоза ввиду полиморфизма его клинических проявлений и преобладания инapparантных форм болезни выдвигают результаты лабораторных (в том числе иммунологических) исследований на первый план при постановке клинического диагноза [8, 11]. И хотя в настоящее время нарушения гуморального и клеточных звеньев иммунитета при токсоплазмозной инвазии довольно хорошо изучены, принципиальные моменты иммунопатогенеза и границы клинико-лабораторного полиморфизма токсоплазмоза до конца не выяснены, особенно в случае микст-инфекции, которая потенцирует клеточную иммунологическую недостаточность, является ее индикатором и характеризуется полиорганными поражениями [5].

Широкое распространение возбудителя, которым является *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), и его важная роль в формировании патологии различных возрастных групп населения обуславливают необходимость проведения дифференциальной диагностики между инapparантным токсоплазмозом и носительством, в том числе — на основе новых методологических подходов и методов, позволяющих установить наличие и активность инфекционного процесса, что имеет особо важное значение на фоне роста иммунодефицитных состояний. Одним из таких новых и перспективных подходов может явиться изучение уровня сывороточных цитокинов, отражающее текущее со-

стояние иммунной системы и развитие защитных реакций *in vivo* [3, 10].

По мнению большинства авторов, главная роль при формировании нестерильного иммунитета против токсоплазм принадлежит клеточному звену иммунитета, а реакции гуморального иммунитета играют соподчиненную роль: при этом эффективность защитных реакций макроорганизма зависит в значительной степени от характера паразитирования возбудителя и состояния различных звеньев иммунной системы [6, 7, 12, 14]. Согласно современным представлениям, иммунопатогенез реактивации хронического токсоплазмоза, так же как и формирование хронических форм при остром токсоплазмозе, прежде всего зависит от смещения тонкого баланса Th1- и Th2-типов иммунного ответа в сторону Th2 (за счет снижения уровня IFN γ) с последующей активацией синтеза значительных количеств IL-4 и сопряженной с этим поликлональной активацией В-лимфоцитов с гиперпродукцией неспецифических антител, которые в присутствии комплемента элиминируют межклеточное пространство от паразита, но не способны лизировать инвазированные *T. gondii* клетки [7, 12, 14]. В этой связи изучение цитокиновой системы как одной из регуляторных систем, поддерживающей гомеостаз организма, у лиц, инфицированных *T. gondii*, имеет особый практический интерес, позволяющий оптимизировать лечебно-диагностические подходы у больных с различными формами токсоплазмоза, в том числе и на фоне микст-инфицирования другими внутриклеточными патогенами.

Целью настоящего исследования явилась оценка степени иммунной дисфункции по состоянию цитокиновой системы у детей с малыми формами туберкулеза, инфицированных *T. gondii* и Epstein-Barr virus (EBV).

Материалы и методы

Обследовано 122 ребенка с малыми формами туберкулеза (тубинфицированием) в возрасте от 7 до 16 лет, находившихся в Санаторно-лесной школе Омской области. Методом иммуноферментного анализа исследована сыворотка крови на наличие антител к *T. gondii* класса IgM, IgA, IgG (тест-системы фирмы «Euroimmun AG», Германия), а также антител к EBV: капсидному антигену (VCA-IgM), ранним белкам (IgG-EA) и ядерному (IgG-NA) антигену (тест-системы

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ У ДЕТЕЙ С МАЛЫМИ ФОРМАМИ ТУБЕРКУЛЕЗА ПРИ МИКСТ-ИНФЕКЦИИ

Показатель, пкг/мл	Диагностические группы				Контроль
	I	II	III	IV	
IL-1 β	** 140,27 \pm 51,37	** 399,81 \pm 333,65	# 18,32 \pm 0,70	** 76,16 \pm 28,46	22,63 \pm 2,85
IL-4	*** 529,67 \pm 114,26	** 509,20 \pm 443,20	* 423,40 \pm 362,90	*** 278,01 \pm 76,63	7,07 \pm 1,67
IL-8	*** 60,06 \pm 10,46	** # 61,36 \pm 4,20	* 61,64 \pm 7,94	*** 42,53 \pm 2,58	20,46 \pm 1,51
IL-1Ra	*** ° 208,62 \pm 51,08	383,00 \pm 230,45	* # 72,41 \pm 9,53	*** 246,20 \pm 109,09	400,52 \pm 20,22
IFN γ натив.	*** 46,50 \pm 7,09	** 76,72 \pm 7,17	* 44,52 \pm 3,90	** 39,15 \pm 10,12	13,21 \pm 3,25
IFN γ стим. ФГА	# 1331,53 \pm 386,12	1764,16 \pm 1191,86	* 267,33 \pm 91,07	2976 \pm 597,90	1494,68 \pm 246,5

Примечание: *, **, *** – достоверность различий по отношению к контролю ($p < 0,05$; $0,01$; $0,001$); достоверность различий между группами: ° – между I и III ($p < 0,05$); достоверность различий с группой сравнения: # – $p < 0,05$ по U-критерию.

ЗАО «Вектор-Бест», Россия). Постановка реакции проводилась согласно прилагаемой к каждому набору инструкции на автоматическом ИФА-анализаторе «Elisys Quattro» («Human», Германия). По результатам тестирования сывороток сформированы следующие диагностические группы: I – дети, серопозитивные к *T. gondii* только по IgG, II – дети, у которых были выявлены IgM или IgA к *T. gondii*, что свидетельствовало об активном течении токсоплазмоза, III – дети, серопозитивные к *T. gondii* по IgA и EBV-IgG-EA (микст-инфекция с признаками активации токсоплазмоза и EBV-инфекции), IV (группа сравнения) – тубинфицированные дети, серонегативные к *T. gondii* и EBV-IgG-EA. Поскольку в исследованных сыворотках сочетания антител токсо-IgM и/или IgA + EBV-VCA-IgM не обнаружено, а изолированное обнаружение антител к EBV класса IgG-NA без IgG-EA (маркера активной EBV-инфекции), по нашему мнению, свидетельствовало о паст-инфекции, то указанные случаи в настоящее исследование не вошли. Контрольную группу составили 30 практически здоровых лиц. Наряду с оценкой специфического иммунитета в сыворотках крови детей методом ИФА согласно прилагаемым инструкциям определяли содержание IL-1 β , IL-4, спонтанного и стимулированного ФГА IFN γ (тест-системы производства ООО «Протеиновый контур», Санкт-Петербург), IL-1Ra и IL-8 (тест-системы ООО «Цитокин», Санкт-Петербург). Результаты учитывали на спектрофотометре «Multiscan-EX» («Labsystems», Финляндия).

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ «Statistica 6.0» для Windows. С учетом небольшого объема выборок для сравнения групп использовался U-критерий Манна–Уитни, который представляет непараметрическую альтернативу t-критерию для независимых выборок.

Результаты

Результаты исследования, представленные в таблице 1, позволили установить следующее. В I–III группах выявлено параллельное увеличение содержания IL-4 и спонтанного IFN γ , что характерно для Th0-клеток [15]. При этом увеличение уровней этих цитокинов в указанных группах по сравнению с контролем для IL-4 было весьма значительным и составило десятки раз ($p < 0,001$; $p < 0,01$; $p < 0,05$), а для спонтанного IFN γ превышало контрольные значения в 3,4–5,8 раз ($p < 0,001$; $p < 0,01$; $p < 0,05$). Обращал на себя внимание и тот факт, что только в III группе отмечалась сниженная в 5,5 раза ($p < 0,05$) по отношению к контролю продукция стимулированного ФГА IFN γ . Кроме того, в этой же группе установлен сниженный более чем в 4 раза ($p < 0,05$) по отношению к группе сравнения синтез IL-1 β . В I, II и IV группах установлено высокое содержание IL-1 β на фоне низкого (по отношению к контролю) содержания его рецепторного антагониста (IL-1Ra), при этом самая низкая концентрация IL-1Ra отмечалась в III группе: в 5,5 раза ниже ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой и в 3,4 раза ниже ($p < 0,05$), чем в группе сравнения.

Уровень IL-8 в I–III группах был практически одинаковым и достоверно превышал в 2,9–3 раза ($p < 0,001$; $p < 0,01$; $p < 0,05$) аналогичный показатель контроля, но только во II группе установлено его увеличение в 1,44 раза ($p < 0,05$) по отношению к группе сравнения, что, учитывая важную роль IL-8 в процессах развития острого и хронического воспаления, соответствовало литературным данным [10].

Обсуждение

Установленное в I–III группах параллельное увеличение содержания IL-4 и спонтанного IFN γ дает

основание полагать, что отсутствие четкой дифференцировки по типам иммунного ответа в указанных группах обусловлено, прежде всего, дисфункцией Т-клеточного звена иммунитета на фоне тубинфицирования. В пользу этого предположения свидетельствуют и аналогичные вышеописанным, хотя и менее выраженные изменения в группе сравнения, куда входили тубинфицированные дети без серологических признаков наличия и активности как токсоплазмоза, так и EBV-инфекции. Ограниченный синтез IL-1 β в условиях Т-клеточной дисфункции может явиться одной из причин снижения функциональной способности клеток к синтезу IFN γ , так как IL-1 β совместно с TNF α и IL-15 потенцирует действие IL-12, играющего ведущую роль в синтезе значительных количеств IFN γ [12]. Наряду с этим, мы полагаем, что снижение функциональной способности цитотоксических Т-клеток к синтезу IFN γ в ответ на митоген может быть обусловлено и прямым ингибирующим действием EBV на клеточный иммунитет в условиях активно протекающего токсоплазмоза, что усугубляло иммунную дисфункцию.

Особый интерес представляла установленная в I, II и IV группах гиперпродукция IL-1 β на фоне низкого содержания его рецепторного антагониста. Так, по данным литературы, IL-1Ra играет важную роль в резистентности организма от внутриклеточных патогенов и ограничении дальнейшего повреждения пораженных тканей при развитии воспаления путем регулирования активности IL-1 [3]. Установленный в III группе факт снижения содержания IL-1Ra, по-видимому, является следствием более глубоких нарушений в иммунной системе в условиях активной микст-инфекции, обусловленной сочетанием *T. gondii*, EBV и *M. tuberculosis*.

Таким образом, полученные нами результаты исследования IL-1 β , IL-1Ra, IL-4, IL-8 и IFN γ свидетельствуют о наличии выраженной иммунной дисфункции у детей с малыми формами туберкулеза, степень выраженности которой усиливается в условиях микст-инфицирования *T. gondii* и особенно при активной микст-инфекции, обусловленной *T. gondii*, EBV и *M. tuberculosis*. Представленные аспекты иммунопатогенеза расширяют возможности мониторинга детей с тубинфицированием и обосновывают целесообразность проведения адекватных иммунореабилитационных мероприятий, направленных на снижение риска развития сопутствующей патологии.

Список литературы

1. Гончаров Д.Б. Значение персистенции *Toxoplasma gondii* в клинической патологии человека // Журн. микробиол. — 2006. — № 4. — С. 92-97.
2. Грачева Л.И. Проблема токсоплазмоза // Педиатрия. — 1999. — № 4. — С. 83-86.
3. Демьянов А.В., Котов А.Ю., Симбирцев А.С. Диагностическая ценность исследования уровней цитокинов в клинической практике // Цитокины и воспаление. — 2003. — Т. 2, № 3. — С. 20-35.
4. Долгих Т.И. Актуальные оппортунистические инфекции (вопросы эпидемиологии, иммунологии, лабораторной диагностики и профилактики): Дисс. ... докт. мед. наук. — Омск, 2000. — 258 с.
5. Долгих Т.И., Безнощенко Г.Б. Внутриутробные инфекции (вопросы диагностики и врачебной тактики). — Н. Новгород: изд-во НГМА, 2003. — 140 с.
6. Казанцев А.П. Токсоплазмоз. — Л.: Медицина, 1985. — 168 с.
7. Лобзин Ю.В., Калинина Н.А., Васильев В.В., Сысоев К.А. Иммуномодуляция токсоплазмой в лечении хронического токсоплазмоза // Мед. иммунология. — 2000. — Т. 2, № 3. — С. 299-304.
8. Пашанина Т.П., Напалкова Г.М., Корсакова И.И., Мананков В.В. Распространение токсоплазмоза и методы его лабораторной диагностики // Мед. паразитология и паразитар. болезни. — 2005. — № 1. — С. 51-54.
9. Прозоровский С.В., Тартаковский И.С. Возбудители оппортунистических инфекций — роль в инфекционной патологии человека и методы лабораторной диагностики // Клинич. лаб. диагностика. — 1998. — № 2. — С. 24, 33-35.
10. Рябичева Т.Г., Варахсин Н.А., Тимофеева Н.В., Руковишников М.Ю. Определение цитокинов методом иммуноферментного анализа // Информационный бюллетень «Новости «Вектор-Бест». — 2004. — № 4 (34) — С. 7-14.
11. Чебуркин А.В., Мороз Б.В. Оценка серологических тестов на токсоплазмоз у детей и их матерей // Педиатрия. — 2000. — № 6. — С. 46-49.
12. Denkers E.Y., Gazzinelli R.T. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection // Clin. Microbiol. Rev. — 1998. — Vol. 11, N 4. — P. 569-588.
13. Djurkovic-Djakovic O. Toksoplazmoza i imunosupresija // Srp. Arh. Celok. Lek. — 1998. — Vol. 126, N 5-6. — P. 197-203.
14. Hunter C.A., Subauste C.S., Remington J.S. The role of cytokines in toxoplasmosis // Biotherapy. — 1994. — Vol. 7, N 3-4. — P. 237-247.
15. Prigione I., Facchetti P., Ghiotto F., Tasso P., Pistoia V. *Toxoplasma gondii*-specific CD4⁺ T cell clones from healthy, latently infected humans display a Th0 profile of cytokine secretion // Eur. J. Immunol. — 1995. — Vol. 25, N 5. — P. 1298-1305.

поступила в редакцию 28.06.2007

принята к печати 29.09.2007