

СОДЕРЖАНИЕ РАСТВОРИМОГО РЕЦЕПТОРА TNF-p55, АЛЬФА-ДЕФЕНЗИНОВ И ИЗОФОРМ ИНТЕРЛЕЙКИНА-8, IL-8₇₇ И IL-8₇₂ В КРОВИ ДЕТЕЙ

Акалович С.Т.^{*}, Нашкевич Н.Н.^{*},
Кудин А.П.^{**}, Астапов А.А.^{**}, Войтенко Н.Н.^{*,**}

^{*} РНПЦ гематологии и трансфузиологии МЗ РБ, Минск, Беларусь;

^{**} Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь;

^{***} Фонд развития молекулярной гематологии и иммунологии, Москва, Россия.

Резюме. Генерализованные формы менингококковой инфекции (ГФМИ) протекают обычно с ярко выраженной картиной системного воспалительного ответа (СВО). Системная продукция воспалительных цитокинов, их накопление в циркулирующей крови и действие на различные органы и ткани во многом определяет патогенез СВО. В настоящей работе у детей с ГФМИ исследовано содержание в крови и ликворе растворимого рецептора фактора некроза опухолей p55, TNF, нейтрофильных альфа-дефензинов (HNP), и обеих изоформ IL-8, IL-8₇₇ и IL-8₇₂. Определение концентраций цитокинов проводилось с помощью «сэндвич»-ИФА на основе моноклональных антител, полученных нами ранее к исследуемым цитокинам. Было показано, что уровень p55 в крови коррелировал с выраженностью симптомов СВО и тяжестью ГФМИ, тогда как в ликворе более чувствительным маркером воспаления можно считать HNP (human neutrophil peptides), поскольку концентрация HNP в спинномозговой жидкости при положительной динамике болезни снижается существенно быстрее, чем уровень p55. Повышение уровня IL-8₇₇ в плазме крови коррелировало с повышением p55 при ГФМИ ($r = 0,537$, $p = 0,001$), тогда как корреляция между уровнем IL-8₇₂ и уровнем p55 не выявлялась ($r = 0,142$, $p = 0,489$).

Ключевые слова: p55, TNF, IL-8, дефензины, системный воспалительный ответ.

Akalovich S.T., Nashkevich N.N., Kudin A.P., Astapov A.A., Voitenok N.N.

THE LEVELS OF SOLUBLE RECEPTOR OF TUMOR NECROSIS FACTOR P55, TNF, NEUTROPHIL-DERIVED ALPHA-DEFENSINS AND BOTH ISOFORMS OF INTERLEUKIN-8 IN THE BLOOD AND CEREBROSPINAL FLUID (CSF) FROM CHILDREN WITH GENERALIZED FORMS OF MENINGOCOCCAL INFECTION

Abstract. Generalized forms of meningococcal infection (GFMI) are usually accompanied with apparent symptoms of systemic inflammatory response (SIRS). Systemic production of inflammatory cytokines, their accumulation in circulating blood and action on various organs and tissues represent a crucial constituent of SIRS. Current study explored the levels of soluble receptor of tumor necrosis factor (TNF) p55, TNF, neutrophil-derived alpha-defensins (HNP) and both isoforms of Interleukin-8 (IL-8₇₇ and IL-8₇₂) in blood and cerebrospinal fluid (CSF) from children with GFMI. The levels of cytokines were estimated using “sandwich” enzyme-linked immunoassays employing monoclonal antibodies to corresponding cytokines that were previously developed in our laboratory. It was shown that the levels of p55 in the blood correlated with severity of SIRS and GFMI, while the levels of HNP (human neutrophil peptides) in CSF may serve as more sensitive marker of inflammation since HNP levels decreased more rapidly during a recovery of disease comparing to p55.

Адрес для переписки:

Акалович Светлана Тадеушевна, Беларусь,
222720, г. Дзержинск, ул. Кирова, д.10, кв.30.
Тел.: (01716) 5-78-77. E-mail: svkoleda@mail.ru

Elevated levels of IL-8₇₇ during GFMI correlated with the levels of p55 (correlation coefficient 0,142, $p = 0,489$), whereas no correlation between the levels of p55 and IL-8₇₂ was revealed. (*Med. Immunol.*, 2005, vol.7, № 5-6, pp 575-578)

Системный воспалительный ответ (СВО) развивается в ответ на действие различных патогенных факторов (инфекция, политравма, ожоги и др.). Сепсис, собственно, представляет собой СВО, который развивается в ответ на генерализованную инфекцию. Клиническая манифестация СВО схожа во всех случаях и включает признаки острого системного воспаления в их выраженной форме: гипертермию, высокий лейкоцитоз или, напротив, лейкопению, высокий процент незрелых форм лейкоцитов, тахикардию и др. [1]. Современные экспериментальные и клинические данные свидетельствуют, что центральную роль в патогенезе СВО играют воспалительные цитокины, такие как фактор некроза опухолей- α (TNF α), интерлейкин-1 β , интерлейкин-6, интерлейкин-8 (IL-8) и др. [2]. Системная продукция этих факторов, их накопление в циркулирующей крови и действие на различные органы и ткани во многом определяют патогенез СВО. Важнейшим ранним воспалительным цитокином СВО является TNF α . При экспериментальном эндотоксическом шоке у обезьян он достигает пиковой концентрации в крови через 1,5 часа после внутривенного введения эндотоксина, но уже через 3,5-4 часа TNF не определяется в крови за счет связывания с тканями-мишенями, вовлекаемыми в СВО [3]. Биологические эффекты TNF опосредуются его специфическими клеточными рецепторами, p55 и p75, которые отщепляются с поверхности клеток, переходят в растворимую форму и длительно циркулируют в крови после связывания с TNF [3]. Уровень рецепторов TNF α резко повышается в крови при генерализованных формах инфекций [4], в частности, при менингококкемии [5], при онкологических заболеваниях, лимфоме [6], переходе носительства ВИЧ в СПИД [7].

Интерлейкин-8 является ключевым фактором регуляции хемотаксиса и активации нейтрофильных лейкоцитов, синтезируется моноцитами/макрофагами и эндотелиоцитами под действием эндотоксина, TNF α и IL-1 [8]. Существуют две основные изоформы IL-8, включающие 77 или 72 аминокислоты, Ala-IL-8₇₇ и Ser-IL-8₇₂ [8]. IL-8₇₇ был идентифицирован в культуре эндотелиальных клеток и назван «эндотелиальным», тогда как IL-8₇₂ получил название «лейкоцитарного». Общепринятые тест-системы ИФА основаны на антителах к IL-8₇₂ и выявляют «общий» IL-8 (сумму обеих изоформ).

Нейтрофилы участвуют в воспалительных реакциях не только как фагоциты, но и как клетки, выделяющие различные гуморальные факторы (эластаза, катепсин G, азуридин и др.) [10]. К важнейшим микробицидам нейтрофилов относятся альфа-де-

фензины (human neutrophil peptides, HNP) с широким спектром антибактериальной активности [11]. Высокий уровень растворимых дефензинов обнаружен в крови при сепсисе [12].

Генерализованные формы менингококковой инфекции (ГФМИ) протекают обычно с ярко выраженной картиной СВО. В настоящей работе у детей с ГФМИ исследовано содержание в крови и ликворе растворимого рецептора TNF p55, TNF, нейтрофильных альфа-дефензинов HNP, и обеих изоформ IL-8.

Материалы и методы

Клинический материал. В работе исследованы плазма крови и спинномозговая жидкость (СМЖ) 22 больных детей с генерализованными формами менингококковой инфекции (возраст от 3 мес до 14 лет), госпитализированных в детскую инфекционную больницу г. Минска. Группа контроля включала 18 детей того же возраста с хронической соматической патологией в стадии ремиссии (гастродуоденит, тонзиллит) и реконвалесцентов ОРИ. Образцы плазмы крови и СМЖ собирали с добавлением 0,05 М ЭДТА и коктейля ингибиторов протеаз («Roche»), хранили при -40°C .

Определение концентрации цитокинов производилось с помощью «сэндвич» ИФА на основе моноклональных антител, полученных нами ранее против TNF, HNP, Ala-IL-8₇₇ и Ser-IL-8₇₂ по методикам ИФА, разработанным в нашей лаборатории [13-17]. Для определения обеих изоформ IL-8 использовали ИФА, специфичный к IL-8₇₇, и ИФА, который определял сумму двух изоформ IL-8 («общий» IL-8). Моноклональные антитела против растворимого p55 получены в кооперации с д-ром D. Wallach (Weizmann Inst., Израиль). В качестве стандартов ИФА использованы препараты HNP, выделенные из нейтрофилов [18], рекомбинантный p55, предоставленный фирмой «Centocor» и рекомбинантные IL-8₇₇ и IL-8₇₂ («Peprotech»).

Результаты и обсуждение

В обследованной группе детей ГФМИ протекали в тяжелой и среднетяжелой форме, у 12 из них наблюдался комплекс симптомов, характерных для СВО [1]. Изменение содержания исследованных цитокинов в динамике заболевания происходило с разной закономерностью. В первые сутки после госпитализации в крови были достоверно повышены все исследованные факторы, кроме TNF, что, видимо, связано с кратковременностью появления

Таблица

Уровень факторов в крови, нг/мл				Число больных с СВО	Общее число больных
p55	IL-8 ₇₇	«общий» IL-8	HNP		
Не повышен (меньше 1,15)	0,25±0,05	3,10±3,0	324,50±246,0	0	2
Низкий (1,15-3,45)	1,46±0,9	0,45±0,3	199,9±91,7	3	9
Средний (3,45-10)	1,53±0,4	<0,25	515,0±421,9	4	4
Высокий (больше 10)	1,32±0,5	0,98±0,5	207,7±68,0	5	7

Примечания: концентрация исследуемых факторов в плазме здоровых доноров: p55 - 1,6±0,78 нг/мл (16); IL-8₇₇ и «общий» IL-8 – менее 0,125 и 0,60 нг/мл, соответственно (14); HNP – менее 50 нг/мл (15).

в крови при развитии СВО и эндотоксического шока [3].

Уровень p55 был максимальным в первые и вторые сутки госпитализации, затем снижался и на 3 сутки был достоверно ниже, чем в начале лечения, но оставался достоверно выше, чем в группе контроля, на протяжении всего срока наблюдения (в течение 2 недель). Уровень p55 коррелировал с выраженностью симптомов СВО и тяжестью ГФМИ, поэтому снижение концентрации p55 на фоне эффективной терапии можно расценивать как положительный признак. Таблица суммирует показатели уровней IL-8, HNP и частоты СВО в группах больных ГФМИ, распределенных по уровням p55.

Уровень HNP был достоверно повышен только на первой неделе терапии, что свидетельствует о тенденции к снижению уровня HNP в крови по мере угасания воспаления. Не наблюдалось существенной корреляции уровня HNP с частотой СВО или уровнями других факторов (см. табл.). Совокупность имеющихся клинических и экспериментальных данных свидетельствует, что уровень HNP в крови медленнее повышается и медленнее снижается в процессе СВО, чем p55.

Исследование концентрации p55, HNP и обеих изоформ IL-8 в ликворе у детей с менингококковым менингитом позволило выявить достоверное ($p<0,05$) повышение уровня всех факторов в начале заболевания по сравнению с периодом реконвалесценции. При этом содержание факторов в крови дольше оставалось достоверно повышенным, чем в ликворе ($p<0,01$ для p55 и $p<0,001$ для HNP), тогда как концентрация HNP в СМЖ при положительной динамике болезни снижалась существенно быстрее, чем уровень p55, что делает HNP более чувствительным маркером воспаления в ликворе.

Было обнаружено неожиданное несоответствие между уровнем IL-8₇₇ в плазме крови и содержанием «общего» IL-8. В плазме крови части больных выявлялось существенно больше IL-8₇₇, чем «общего» (т.е. суммы обеих изоформ) IL-8. Мы полагаем, что это явление связано с описанным ранее феноменом образования комплексов IL-8 с иммуноглобулинами G в крови, которые препятствуют определению IL-8 в ИФА для «общего» IL-8 [19]. Это явление не наблюдалось ни в одном из образцов СМЖ,

что можно объяснить отсутствием в СМЖ иммуноглобулинов. Таким образом, тест-система для IL-8₇₇ оказалась более информативной, чем обычный ИФА для «общего» IL-8. По-видимому, N-концевой пептид молекулы IL-8₇₇, распознаваемый ИФА для IL-8₇₇ [16], находится вне комплекса с блокирующим иммуноглобулином G. Повышение уровня IL-8₇₇ в плазме крови коррелировало с повышением p55 при ГФМИ ($r = 0,537$, $p = 0,001$, анализ SPSS 8.0), тогда как корреляция между уровнем IL-8₇₂ и уровнем p55 не выявлялась ($r = 0,142$, $p = 0,489$).

Полученные данные указывают, что определение p55, IL-8 и нейтрофильных дефензинов позволяет глубже понять закономерности развития и течения ГФМИ и СВО.

Список литературы

1. Bone R.C., Balk R.A., Cerra F.B., Dellinger R.P., Fein A.M., Knaus W.A., Schein R.M., Sibbald W.J. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine // Chest. - 1992. - V. 101. - P. 1644-1655.
2. Casey L.C. Immunologic response to infection and its role in septic shock // Crit. Care Clin. - 2000. - V. 16. - P. 193-213.
3. Redl H., Schlag G., Adolf G.R., Natmessnig B., Davies J. Tumor necrosis factor (TNF) dependent shedding of the p55 TNF receptors in a baboon model of bacteremia // Infection and Immunity. - 1995. - V. 63. - P. 12-16.
4. Gogos C.A., Drosou E., Bassaris H.P., Skoutelis A. Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options // J Infect Dis. - 2000. - V. 181. - P. 176-180.
5. Kornelisse R.F., Savelkoul H.F., Mulder P.H., Suur M.H., van der Straaten P.J., van der Heijden A.J., Sukhai R.N., Hahlen K., Neijens H.J., de Groot R. Interleukin-10 and soluble tumor necrosis factor receptors in cerebrospinal fluid of children with bacterial meningitis // J Infect Dis. - 1996. - 173. - P. 1498-1502.
6. Warzocha K., Salles G., Bienvenu J., Barbier Y., Bastion Y., Doche C., Rieux C., Coiffier B. Prognostic

significance of TNF alpha and its p55 soluble receptor in malignant lymphomas // *Leukemia*. - 1997. - V. 11. - P.441-443.

7. Fauci A.S. Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease // *Nature*. - 1996 - V. 384. - P. 529-534.

8. Yoshimura T., Robinson E.A., Appella E., Matsushima K., Showalter S.D., Skeel A., Leonard E.J. Three forms of monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) distinguished by different lengths of the amino-terminal sequence // *Mol. Immunol.* - 1989. - V. 26. - P. 87-93.

9. Halstensen A., Ceska M., Brandtzaeg P., Redl H., Naess A., Waage A. Interleukin-8 in serum and cerebrospinal fluid from patients with meningococcal disease // *J Infect Dis.* - 1993. - V. 167. - P. 471-475.

10. Gudmundsson G.H., Agerberth B. Neutrophil antibacterial peptides, multifunctional effector molecules in the mammalian immune system // *J Immunol Methods*. - 1999. - V. 232. - P. 45-54.

11. Ganz T. Antimicrobial polypeptides in host defense of the respiratory tract // *J Clin Invest.* - 2002. - V. 109. - P. 693-697.

12. Panyutich A.V., Panyutich E.A., Krapivin V.A., Baturevich E.A., Ganz T. Plasma defensin concentrations are elevated in patients with septicemia or bacterial meningitis // *J. Lab. Clin. Med.* - 1993. - V. 122. - P. 202-207.

13. Н.В.Петёвка, Н.Н.Нашкевич, И.И.Тихонов, Т.С.Колесникова, С.Т.Колёда, С.С.Бутенко, Т.М.Дорошенко, Н.Н.Войтенко. Иммуноферментный метод определения растворимого Р55 рецептора TNF человека // *Клиническая аллергология и иммунология. Иммунодиагностика и иммунореабилитация. Сб. трудов 2-й Международной конференции и 1 съезда БААКИ.* / Минск-Витебск, 1998.-с.193-195.

14. Panyutich A.V., Voitenok N.N., Lehrer R.I., Ganz T. An enzyme immunoassay for human defensins // *J. Immunol. Methods*. - 1991. - V. 141. - P. 149-155.

15. Nashkevich N.N., Akalovich S., Louneva N., Heavner G.A., Voitenok N.N. A monoclonal antibody and an enzyme immunoassay for human Ala-IL-8(77) // *J Immunol Methods*. - 2002. - V. 270. - P. 37-51.

16. Petyovka N., Lyakh, L., Voitenok N.N. Homologous ELISA for detection of oligomeric human TNF: properties of the assay // *J. Immunol. Methods*. - 1995. - V. 186. - P. 161-170.

17. Ganz T., Selsted M.E., Szklarek D., Harwig S.S., Daher K., Bainton D.F., Lehrer R.I. Dens. Natural peptide antibiotics of human neutrophils // *J. Clin. Invest.* - 1985. - V. 76. - P. 1427-1435.

18. Sylvester I., Yoshimura T., Sticherling M., Schroder J.M., Ceska M., Peichl P., Leonard E.J. Neutrophil attractant protein-1-immunoglobulin G immune and free anti-NAP-1 antibody in normal human serum // *J. Clin. Invest.* - 1992. - V. 90. - P. 471-481.

поступила в редакцию 01.03.2005

принята к печати 10.04.2005