

УДК 610.995.42-02-036.22-07-08

© О. М. Зінчук, В. В. Чоп'як, І. В. Вальчук, 2009.

ТН1-ЦИТОКИНОВА РЕГУЛЯЦІЯ В ХВОРИХ НА ЕРИТЕМНІ ФОРМИ ЛАЙМ-БОРЕЛІОЗУ

О. М. Зінчук, В. В. Чоп'як, І. В. Вальчук

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, м. Львів.

PECULIARITIES OF TH1-CYTOKINE REGULATION IN PATIENTS WITH ERYTHEMATOUS FORMS OF LYME-BORRELIOSIS

A. N. Zinchuk, V. V. Chopyak, I. V. Valchuk

SUMMARY

The aim of the research was to study the character of cytokine regulation and the type of immune response by the means of investigation of TNF- α , INF- γ and IL-2 level in serum. It was established that there is significant increase of the level of TNF- α and INF- γ in patients with erythematous forms of Lyme-borreliosis. On the onset of the disease the reliable increase of TNF- α , INF- γ levels was revealed in patients without the signs of dissemination comparing with those cases, characterized by the signs of impairment of various organs and systems. The type of immune response in Lyme borreliosis must be taken into account in treatment and following out patient control.

ОСОБЕННОСТИ ТН1-ЦИТОКИНОВОЙ РЕГУЛЯЦИИ У БОЛЬНЫХ ЭРИТЕМНЫМИ ФОРМАМИ ЛАЙМ-БОРЕЛЛИОЗА

А. Н. Зинчук, В. В. Чопяк, И. В. Вальчук

РЕЗЮМЕ

Работа посвящена исследованию характера цитокиновой регуляции и типа иммунного ответа при эритемных формах Лайм-боррелиоза путем определения уровня TNF- α , INF- γ и IL-2 в сыворотке крови. Установлено, что у больных эритемными формами Лайм-боррелиоза в дебюте заболевания наблюдается значительное повышение уровня TNF- α , INF- γ . В начале заболевания наблюдается достоверно высший уровень TNF- α , INF- γ у больных без явлений диссеминации сравнительно с больными, у которых кроме мигрирующей эритемы выявлены поражения органов и систем ранней фазы Лайм-боррелиоза. Характер иммунного ответа при Лайм-боррелиозе необходимо учитывать при проведении лечения больных и следующей диспансеризации.

Ключові слова: бореліоз, хвороба Лайма, кліщі, еритема, артрит, нервова система, запалення, цитокіни.

Останнім часом увагу дослідників все більше привертає проблема Лайм-бореліозу (ЛБ). ЛБ – ендемічна зоонозна хвороба, яка широко поширена в лісовій та лісостеповій зоні північної півкулі і є серйозною медико-біологічною проблемою з огляду на схильність до хронізації, ураження багатьох органів і систем (шкіри, суглобів, нервової системи серця, очей), несприятливі наслідки.

Для розуміння механізмів хронізації ЛБ велику роль відіграє вивчення реакцій макроорганізму на присутність збудника, зокрема механізми регуляції запалення та імунітету [1; 2; 3]. У ході бореліозного інфекційного процесу відбувається активація як клітинних, так і гуморальних факторів імунітету [6; 7; 8; 9]. Першою лінією захисту організму є комплемент-залежний лізис збудника. Через 5–10 днів після зараження в периферичній крові з'являються сенсibiliзовані до антигенів борелій макрофаги. Активовані макрофаги, а в подальшому включені в специфічну імунну відповідь Т-хелпери продукують комплекс цитокинів, які потенціюють запальні процеси і скеровують їх розвиток, зокрема α -пухлинонекротизуючий фактор (TNF- α), γ -інтерферон (INF- γ), інтерлейкін-2 (IL-2) [3; 5; 13; 14].

Проведені дослідження свідчать, що цитокіни відіграють вирішальну роль в регуляції специфічних

ефекторних функцій імунокомпетентних клітин на антигенний подразник при бактеріальних інфекціях, зокрема при ЛБ [12; 15; 16]. Будучи неспецифічними стосовно антигенів збудника, цитокіни є медіаторами міжклітинної взаємодії в ході реалізації імунної відповіді.

Характер імунної відповіді на присутність борелій залежить від спектру цитокинів, що продукуються макрофагами, антиген-презентуючими клітинами і особливо Т-хелперами (Th), які визначають їх скерованість за трьома типами (Th1, Th2, Th3) [4]. При домінуючій участі клонів лімфоцитів Th1 відбувається переважаючий синтез IL-2, INF- γ , TNF- α , що призводить до стимуляції процесів ексудативно-проліферативного запалення, імунної відповіді за клітинним типом, яка відіграє важливу роль у елімінації борелій, зокрема L-форм, локалізованих внутрішньоклітинно.

Метою нашого дослідження було з'ясування динаміки концентрації Th1-цитокинів TNF- α , INF- γ та IL-2 у хворих на еритемні форми ЛБ.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Під спостереженням знаходилися 22 хворих на еритемні форми ЛБ віком від 19 до 62 років (середній вік $43,2 \pm 2,9$ років). Серед захворілих було 7 чоловіків і

15 жінок. Діагноз ЛБ встановлювався на основі анамнестичних та клінічних даних і у всіх хворих був підтверджений виявленням в сироватці крові протибореліозних антитіл класів М та (або) G. У всіх хворих в анамнезі було присмоктання кліща. Тривалість інкубаційного періоду (від присмоктання кліща до появи еритеми) склала в середньому $15,5 \pm 1,3$ днів. Час від появи еритеми до звертання за медичною допомогою становив від 5 до 12 днів (в середньому $7,7 \pm 0,4$ днів). У 17 хворих з 22 виявлена мігруюча еритема без ознак дисемінації збудника. У 5 хворих спостерігалися ознаки дисемінації з органічними ураженнями, характерними для ранньої фази хвороби, зокрема полірадикулонейропатія (3 хворих, з них у одного хворого полірадикулонейропатія була поєднана з гепатитом), Лайм-артрит (1 хворий), гепатит (1 хворий). Розміри еритеми у хворих становили від 4 до 35 см (в середньому 18,3 см). У 12 хворих еритема була кільцеподібною, у 10 хворих – гомогенною.

Для специфічного підтвердження діагнозу проводилося визначення протибореліозних антитіл класів IgM і (або) IgG в ІФА. Використовувалася тест-система «Lyme-Best» ЗАО «Vector-Best» (Новосибірськ, Росія). Для етіотропного лікування призначався доксициклін по 0,1 г два рази на добу 14–21 дні.

Для вивчення характеру цитокінової регуляції визначався рівень TNF- α , ІФН- γ та ІЛ-2 у 22 хворих з мігруючою еритемою (1-а група). Крім того, з числа цих хворих у окремі групи відібрано пацієнтів, у яких виявлена мігруюча еритема без ознак дисемінації (2-а група), а також з ознаками дисемінації (3-а група). У всіх хворих дослідження цитокінів проводився три рази – до лікування, на 14 день лікування і через 3

місяці від початку лікування. Отримані дані порівнювали з відповідними даними контрольної групи (20 здорових донорів крові), що була схожою за віком і статтю.

Рівень цитокінів у сироватці крові визначали за допомогою імуноферментного аналізу з використанням комерційних тест-систем згідно інструкції фірми-виробника. Використовували сертифіковані в Україні тест-системи для визначення TNF- α , ІФН- γ та ІЛ-2 виробництва фірми «Протеиновый контур» (Російська Федерація, Санкт-Петербург). Вимірювання проводили за допомогою вертикального спектрофотометра Sunrisc «TECHN» (Австрія, 2006 р). Кількісний вміст цитокінів у сироватці крові визначали в пг/мл.

Статистична обробка отриманих даних проводилася на комп'ютері Pentium 4 з використанням статистичного модуля створеної на кафедрі інфекційних хвороб ЛНМУ ім. Данила Галицького прикладної програми «Електронний архів».

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відповідно до отриманих даних, у хворих на еритемні форми ЛБ до лікування спостерігалось значне підвищення рівня TNF- α в сироватці крові (таблиця 1). Так, у хворих 1-ї групи середній рівень цього цитокіну до лікування становив $234,43 \pm 33,13$ пг/мл, тоді як у групі порівняння тільки $59,41 \pm 3,81$ пг/мл ($P < 0,001$). На 14 день лікування спостерігалось різке зниження рівня TNF- α у всіх хворих 1-ї групи в середньому до $81,66 \pm 6,62$ пг/мл. Через 3 місяці від початку лікування рівень TNF- α у 1-й групі незначно відрізнявся від групи порівняння (відповідно $69,03 \pm 8,25$ і $59,41 \pm 3,81$ пг/мл; $P > 0,05$).

Таблиця 1

Рівень TNF- α у сироватці крові хворих на еритемні форми

Терміни обстеження	TNF- α (пг/мл)		
	Всі хворі на еритемні форми ЛБ (група 1)	3 них без ознак дисемінації (група 2)	3 них із наявністю ознак дисемінації (група 3)
До лікування	$234,43 \pm 33,13^{**}$ (n=22)	$276,54 \pm 36,77^{**\#}$ (n=17)	$91,28 \pm 18,38$ (n=5)
На 14 день лікування	$81,66 \pm 6,62^*$ (n=19)	$86,94 \pm 8,03^*$ (n=14)	$66,9 \pm 9,44$ (n=5)
Через 3 міс після лікування	$69,03 \pm 8,25$ (n=16)	$71,41 \pm 10,06$ (n=12)	$61,90 \pm 14,99$ (n=4)
Група порівняння (n=20)	$59,41 \pm 3,81$		

Примітки: 1. Зірочками позначено статистично вірогідні відмінності порівняно з групою контролю. * – $P < 0,01$; ** – $P < 0,001$; 2. Значком «#» позначено статистично вірогідну відмінність між 2-ю та 3-ю групами ($P < 0,001$).

Звертає на себе увагу значно вищий рівень TNF- α до лікування у хворих без ознак дисемінації (2-а група) порівняно з хворими, у яких окрім МЕ виявлено ураження органів і систем ранньої фази ЛБ (3-а група) – відповідно $276,54 \pm 36,77$ і $91,28 \pm 18,38$ пг/мл

($P < 0,001$). У подальшому спостерігалось зниження рівня TNF- α у хворих обох груп і до 3-го місяця від початку лікування він незначно відрізнявся від групи порівняння.

Динаміка ІФН- γ в процесі лікування була багато в

чому схожою (таблиця 2). Так, у хворих 1-ї групи середній рівень INF- γ становив $37,05 \pm 4,66$ пг/мл, тоді як у групі порівняння тільки $21,88 \pm 1,64$ пг/мл ($P < 0,01$). На 14 день спостерігалася зниження рівня INF- γ до $26,83 \pm 1,38$ пг/мл, хоча він залишався вищим, ніж у

групі порівняння ($P < 0,05$). Через 3 місяці від початку лікування у хворих спостерігалася нормалізація рівня INF- γ , який наближався до рівня осіб групи порівняння (відповідно $23,49 \pm 0,99$ і $21,88 \pm 1,64$ пг/мл, $P > 0,05$)

Таблиця 2

Рівень INF- γ у сироватці крові хворих на еритемні форми ЛБ

Терміни обстеження	INF- γ (пг/мл)		
	Всі хворі на еритемні форми ЛБ (група 1)	3 них без ознак дисемінації (група 2)	3 них із наявністю ознак дисемінації (група 3)
До лікування	$37,05 \pm 4,66^{**}$ (n=22)	$40,68 \pm 5,33^{***\#}$ (n=17)	$22,92 \pm 2,48$ (n=5)
На 14 день лікування	$26,83 \pm 1,38^*$ (n=19)	$26,42 \pm 1,64$ (n=14)	$27,99 \pm 2,78^1$ (n=5)
Через 3 міс після лікування	$23,49 \pm 0,99$ (n=16)	$22,85 \pm 1,00$ (n=12)	$25,89 \pm 4,64$ (n=4)
Група порівняння (n=20)	$21,88 \pm 1,64$		

Примітки: 1. Зірочками позначено статистично вірогідні відмінності порівняно з групою порівняння. * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$; «1» – $t=1,89$; 2. Значком «#» позначено статистично вірогідну відмінність між групами 2 і 3 ($P < 0,01$).

Заслужують на увагу відмінності рівня INF- γ у хворих на еритемні форми ЛБ без ознак дисемінації збудника і у хворих, у яких окрім мігруючої еритеми (МЕ) виявлено ураження органів і систем ранньої фази ЛБ. Так, у хворих 2-ї групи до лікування рівень INF- γ був значно вищим, ніж у 3-ї групи (відповідно $40,68 \pm 5,33$ і $22,92 \pm 2,48$, $P < 0,01$).

Нами виявлено різнонаправлену динаміку рівня INF- γ у хворих 2-ї та 3-ї груп – на 14 день лікування спостерігалася тенденція до нормалізації рівня цитокіна в 2-й ($26,42 \pm 1,64$ пг/мл) і, навпаки, підвищення рівня INF- γ хворих 3-ї групи, у яких цей показник був помітно вищим, ніж в групі порівняння, що вказує на певну тенденцію (відповідно $27,99 \pm 2,78$ і $21,88 \pm 1,64$ пг/мл, $t=1,89$). Через 3 місяці від початку лікування спостерігалася зниження показників INF- γ до рівня групи порівняння як хворих 2-ї групи ($22,85 \pm 1,00$ пг/мл), так і хворих 3-ї групи ($25,89 \pm 4,64$ пг/мл), за винятком одного хворого із затяжним перебігом Лайм-артриту, який виник через 1,5 місяці від початку еритеми і у якого рівень INF- γ через три місяці від початку лікування сягав $39,63$ пг/мл.

Не виявлено вірогідних відмінностей рівня IL-2 порівняно з групою порівняння. До лікування середній рівень IL-2 був $51,57 \pm 3,18$ пг/мл (в групі порівняння $48,49 \pm 3,14$ пг/мл), через 14 днів – $52,24 \pm 3,04$ пг/мл і через 3 міс – $47,89 \pm 5,0$ пг/мл ($P > 0,05$).

Нами проведено кореляційний аналіз між рівнем Th1-цитокінів сироватки крові хворих на еритемні форми і вираженістю окремих клінічних симптомів і ознак ЛБ. Виявлено зворотну кореляційну залежність між діаметром мігруючої еритеми і рівнем TNF- α

сироватки крові до лікування. Так, у 13 хворих із 22 з рівнем TNF- α до 200 пг/мл розміри еритеми сягали від 10 до 35 см (в середньому $20,9$ см), тоді як у решти 9 хворих з рівнем TNF- α понад 200 пг/мл розміри еритеми були від 4 до 25 (в середньому $13,4$ см). Статистичний аналіз підтверджує зворотний кореляційний зв'язок між рівнем TNF- α і розмірами еритеми ($r_{xy} = -0,54 \pm 0,19$; $P < 0,01$).

У хворих на ЛБ не виявлено кореляції між рівнем цитокінів IFN- γ , IL-2 та величиною еритеми. Також не виявлено кореляції між рівнем TNF- α , IFN- γ та IL-2 у сироватці крові в різні періоди хвороби та іншими клінічними ознаками ЛБ, а також титром протибореліозних антитіл класів M та G.

Отже, у хворих на еритемні форми Лайм-бореліозу на початку захворювання спостерігається значне підвищення рівня TNF- α та INF- γ , причому виявлений вірогідно вищий рівень TNF- α та INF- γ у хворих без ознак дисемінації порівняно з хворими, у яких окрім МЕ виявлено ураження органів і систем ранньої фази ЛБ. Можна думати, TNF- α та INF- γ сприяють обмеженню масштабів інфекційного процесу в гостру фазу ЛБ, швидшому видаленню збудника з організму і є прогностично сприятливим фактором.

ВИСНОВКИ

1. У хворих на еритемні форми Лайм-бореліозу в дебюті захворювання спостерігається значне підвищення рівня TNF- α та INF- γ .

2. На початку захворювання виявлений вірогідно вищий рівень TNF- α та INF- γ у хворих без ознак дисемінації порівняно з хворими, у яких окрім мігру-

ючої еритеми виявлено ураження органів і систем ранньої фази Лайм-бореліозу.

3. Характер імунної відповіді при Лайм-бореліозі необхідно враховувати при проведенні лікування хворих і наступній диспансеризації.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бейкин Я.Б., Лагерева Ю.Г., Топоркова М.Г. и др. Особенности цитокиновой регуляции при клещевом энцефалите и Лайм-боррелиозе // Вестник Рос. акад. мед. наук. – 2007. – № 9. – С. 16–19.

2. Мальй В.П., Кратенко И.С. Системный клещевой боррелиоз. – 2006. – 128 с.

3. Федоров У.С., Барскова В.Г., Ананьева Л.П. а др. Механизмы регуляции воспаления и иммунитета в патогенезе болезни Лайма // Клиническая медицина. – 1999. – № 6. – С. 14–19.

4. Якобисяк М. Імунологія / Переклад з польської за редакцією проф. В.В. Чоп'як. – Вінниця: Нова книга, 2004. – 672 с.

5. Glickstein L., Moore B., Bledsoet T. et al. Inflammatory cytokine production predominates in early Lyme disease in patients with erythema migrans // *Infect. Immun.* – 2003. – V. 71. – P. 6051–6053.

6. Alitalo A., Meri T., Lankinen H. et al. Complement inhibitor factor H binding to Lyme disease spirochetes is mediated by inducible expression of multiple plasmid-encoded outer surface protein E paralogs // *J. Immunol.* – 2002. – V. 169. – P. 3847–3853.

7. Kraiczy P., Hellwage J., Skerka C. et al. Complement resistance of *Borrelia burgdorferi* correlates with the expression of BbCRASP-1, a novel linear plasmid-encoded surface protein that interacts with human factor H and FHL-1 and is unrelated to Erp proteins // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279. – P. 2421–2429.

8. McDowell J.V., Wolfgang J., Tran E. et al. Comprehensive analysis of the factor H binding

capabilities of *borrelia* species associated with Lyme disease: delineation of two distinct classes of factor H binding proteins // *Infect. Immun.* – 2003. – V. 71. – P. 3597–3602.

9. Stevenson B., El-Hage N., Hines et al. Differential binding of host complement inhibitor factor H by *Borrelia burgdorferi* Erp surface proteins: a possible mechanism underlying the expansive host range of Lyme disease spirochetes // *Infect. Immun.* – 2002. – V. 70. – P. 491–497.

10. Федоров У.С., Барскова В.Г., Ананьева Л.П. а др. Механизмы регуляции воспаления и иммунитета в патогенезе болезни Лайма // Клиническая медицина. – 1999. – № 6. – С. 14–19.

11. Glickstein L., Moore B., Bledsoet T. et al. Inflammatory cytokine production predominates in early Lyme disease in patients with erythema migrans // *Infect. Immun.* – 2003. – V. 71. – P. 6051–6053.

12. Lyme Borreliosis and Tick-Borne Encephalitis / Eds. Oschmann P., Kraiczy P. et al. – Bremen, 1999. – 144 p.

13. Montgomery R.R., Lusitani D., de Boisfleury Chevance A., Malawista S.E. Human phagocytic cells in the early innate immune response to *Borrelia burgdorferi* // *J. Infect. Dis.* – 2002. – V. 185. – P. 1773–1779.

14. Mullegger R.R., McHugh G., Ruthazer R. Differential expression of cytokine mRNA in skin specimens from patients with erythema migrans or acrodermatitis chronica atrophicans // *J. Invest. Dermatol.* – 2000. – V. 115. – P. 1115–1123.

15. Salazar J.C., Pope C.D., Sellati T.J. et al. Coevolution of markers of innate and adaptive immunity in skin and peripheral blood of patients with erythema migrans // *J. Immunol.* – 2003. – V. 171. – P. 2660–2670.

16. Wooten R.M., Ma R.A., Yoder J.P. et al. Toll-like receptor 2 is required for innate, but not acquired, host defense to *Borrelia burgdorferi* // *J. Immunol.* – 2002. – V. 168. – P. 348–355.