

ИССЛЕДОВАНИЕ УРОВНЯ ЦИТОКИНОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ БАКТЕРИОНОСИТЕЛЕЙ

¹Бойко О.В., ¹Ахминеева А.Х., ¹Гудинская Н.И., ²Алексашина Л.И.

¹ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздрава России, Астрахань

²ФГБОУ ВПО «Астраханский государственный университет», Астрахань, e-mail oboyko08@rambler.ru

В статье проанализировано состояние интерлейкинового статуса при стафилококковом бактерионосительстве. Наиболее заметные изменения выявлены при персистенции золотистого стафилококка. Реакция организма больного на внедрение этого вида микроорганизмов сопровождается преобладанием противовоспалительных механизмов, что позволяет микробной клетке обосновываться в макроорганизме. Установлено, что внедрение золотистого стафилококка вызывает, наряду с адекватным ростом ИЛ 8, выраженный патологический рост ИЛ 10, что позволяет бактериям избежать опсонизации и фагоцитоза. Располагающиеся же внутриклеточно резидентные штаммы уже не вызывают таких изменений и соотношение про- и противовоспалительных цитокинов несколько нормализуется. Возможно, это связано с тем, что резидентное носительство характеризуется внутриклеточным расположением возбудителя, что исключает его плотный контакт с иммунной системой и, как следствие, постоянной ее стимуляцией. У носителей *S.epidermidis* реакция ИЛ несколько иная, но также отмечается рост ИЛ 10. Постоянное присутствие этого вида стафилококка у резидентных носителей сопряжено с ростом провоспалительного цитокина – ИЛ 8, что представляется логичным, так как *S.epidermidis* по литературным данным, в отличие от *S.aureus*, не обладает целым рядом экранирующих структур, затрудняющих его распознавание иммунной системой при персистирующей инфекции.

Ключевые слова: бактерионосительство, цитокины, сыворотка, семенная плазма.

STUDY OF CYTOKINE LEVELS IN BIOLOGICAL FLUIDS OF BACTERIA CARRIERS

¹Boiko O.V., ¹Akhmineeva A.K., ¹Gudinskaya N.I., ²Aleksashina L.I.

¹Astrakhan State Medical Academy, the Ministry of Health of Russia, Astrakhan

²Astrakhan State University, Astrakhan

The article analyzes interleukin status for staphylococcus bacteria carrying. The most notable changes were found at the persistence of *Staphylococcus aureus*. The reaction of the patient to the implementation of this type of microorganisms is accompanied by a predominance of anti-inflammatory mechanisms that allow microbial cells to settle in macroorganism. It is found that the introduction of *Staphylococcus aureus* causes, along with a normal increase in IL-8, IL pronounced abnormal growth of 10, which allows the bacteria to avoid opsonization and phagocytosis. Is located intracellularly resident strains do not cause such changes, and the ratio of pro-and anti-inflammatory cytokines few normal. Perhaps this is due to the fact that the resident carrier is characterized by an intracellular location of the pathogen, which excludes its close contact with the immune system and, as a consequence, its constant stimulation. Carriers *S.epidermidis* IL reaction is somewhat different, but also noted the growth of IL 10. The constant presence of this species in resident *S.aureus* carriers associated with proinflammatory cytokine growth – IL-8, which is logical since *S.epidermidis* from the literature, unlike *S.aureus*, does not possess a variety of shielding structures that impede its recognition by the immune system persistent infection.

Keywords: bacteria carrier, cytokines, serum, seminal plasma.

Многообразие биологических эффектов цитокинов, их ключевая роль как медиаторов межклеточного взаимодействия в поддержании гомеостаза предполагают участие во многих патологических процессах, в том числе и в развитии бактерионосительства.

В связи с тем, что для цитокинов характерны плеiotропность, дублирующие и перекрывающие эффекты, мы решили проанализировать уровень классического провоспалительного цитокина: ИЛ-8 и цитокина, относимого к противовоспалительной группе – ИЛ-10. Кроме того, по общему мнению роль именно этих медиаторов велика в

возникновении хронических инфекций. Роль этих цитокинов в бактерионосительстве ранее не рассматривалась [1,2].

В целом об этих соединениях известны следующие факты. ИЛ-8 является, как все интерлейкины, индуцибельным белком. Под воздействием ЛПС, а также ИЛ-1, 3, TNF α и главного комплекса гистосовместимости происходит синтез ИЛ-8, и последний может быть обнаружен в культуральной среде через 3 ч после индукции. ИЛ-8 является хематтрактантом не только для нейтрофильных лейкоцитов, но и для макрофагов, лимфоцитов и эозинофилов [6,7,11].

Помимо основной функции, ИЛ-8 способствует усилению адгезивных свойств нейтрофилов, генерации активных форм кислорода, активации пентозофосфатного шунта, подъем концентрации внутриклеточного Ca²⁺, изменяет форму нейтрофильных лейкоцитов, способствует экзоцитозу. Механизм повышенной адгезивности, как было показано, связан с нарушением экспрессии гликопротеинов CD11 – CD18 на поверхности нейтрофилов [8,9].

Можно сделать вывод, что ИЛ-8 является мощным индуктором острой воспалительной реакции, вызывая миграцию нейтрофилов в очаг проникновения патогена. Однако, судя по тому, что его синтез может происходить под воздействием ИЛ-1 α и - β , а также TNF α . ИЛ-8 может также играть роль одного из патогенетических звеньев в хроническом воспалении.

Альтернативным регулирующим цитокином для макрофагов является типичный противовоспалительный цитокин IL-10, который ингибирует все те свойства и функции макрофагов, которые стимулируют γ -IFN. Его продуцентами могут быть либо сами моноциты/макрофаги, либо активированные Th2 и, как было показано недавно, активированные Th1. Этот цитокин является физиологическим антагонистом и ингибитором синтеза IL-12, ингибирует продукцию γ -IFN и весь Th1-ответ. IL-10 ингибирует продукцию макрофагами всех провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF α , MIF), экспрессию рецепторов TNF α и IL-12 на ЕК. Кроме того, IL-10 ингибирует продукцию и секрецию всех цитокинов всеми Т-хелперами, включая IL-4 и IL-5.

IL-10 ингибирует воспалительный ответ независимо от принадлежности участвующих в нем клеток к той или иной субпопуляции Th. Повышенная чувствительность Th1-клеток к негативной регуляции IL-10 связана с их зависимостью от паракринной регуляции их дифференцировки IL-12, продукцию которого АПК ингибирует IL-10 [5].

Материалы и методы

Определяя уровень цитокинов в сыворотке крови и семенной плазме, мы выделяли группы резидентных и транзиторных носителей. К резидентной группе относятся

«злостные» носители, у которых постоянно выделяется стафилококк одних и тех же фаготипов, с множественной антибиотикоустойчивостью. К транзиторной группе относятся носители, у которых также выделяется стафилококк, но фаготипы и количество его меняются [4].

ИЛ 8 и ИЛ 10 определяли с помощью соответствующих «Иммуноферментных тест-систем для количественного определения уровня цитокинов человека в биологических жидкостях и культуральных средах», пр-во: ООО «Цитокин», С.-Петербург, в соответствии с прилагаемой инструкцией.

Результаты и обсуждение

Распределение уровня интерлейкинов в сыворотке крови при различных видах бактерионосительства выглядело следующим образом (таблица 1).

Таблица 1

Содержание ИЛ 8 и ИЛ 10 в сыворотке крови бактерионосителей
($M \pm m$, пг/мл)

Вид носительства	Кол-во обследованных (n)	ИЛ 8	Достоверность различий с нормальными показателями	ИЛ 10	Достоверность различий с нормальными показателями
<i>S.aureus</i> резидентный	100	36,9±2,02	<0,01	38,6±1,8	<0,001
<i>S.aureus</i> транзиторный	100	58,1±0,68	<0,01	112,6±2.31	<0,001
<i>S.epidermidis</i> резидентный	120	51,2±0,7	<0.01	23,8±0,3	<0,01
<i>S.epidermidis</i> транзиторный	120	29,6±1,62	<0,01	18,07±1,4	<0,05

Нами было определено, что наибольшее отклонение в системе иммунитета вызывает носительство *S.aureus* транзиторного типа. Уровень ИЛ 10 у таких больных превышает норму в 31,8 раза, а ИЛ 8 – только в 2,6 раза. Для сравнения *S.aureus* в стадии резервации такой гиперергической реакции со стороны иммунной системы не вызывает, хотя и его показатели значительно выше нормы и преобладание противовоспалительной реакции сохраняется: ИЛ 10 больше нормы в 10,7 раза, ИЛ 8 – в 1,8 раза.

В то же время *S.epidermidis* обладает, судя по всему, более «скромными» возможностями влияния на систему ИЛ. Так, транзиторные носители имеют показатели, близкие к норме по ИЛ 8 (больше нормальных в 1,3 раза), превышающие по ИЛ 10 в 4,9 раза. Переходя к рассмотрению резидентного носительства *S.epidermidis*, необходимо отметить, что оно протекает при более чем шестикратном увеличении ИЛ 10 (6,8 раза), росте уровня

ИЛ 8 в 2,3 раза, что сопоставимо в абсолютных числах с уровнем резидентного носительства *S.aureus*.

Было установлено, что при всех вариантах бактерионосительства наибольшие изменения биохимических параметров сыворотки крови в организме больного вызывает присутствие *S.aureus*. Соотношение ИЛ 8/ИЛ 10 в норме составляет 6,2/1 [9]; однако, у транзиторных носителей золотистого стафилококка оно составило 0,5/1, а у эпидермального – 1,64/1. Таким образом, носительство *S.aureus* и *S.epidermidis* достоверно ($p < 0,001$) вызывает дисбаланс в системе интерлейкинов в сторону угнетения воспалительной реакции, что, судя по всему, позволяет микробной клетке спокойно обосноваться в макроорганизме.

При переходе возбудителя обоих типов в стадию резервации, эти нарушения несколько нормализуются, но сохраняются более выраженными у *S.aureus* (1,03/1), а у *S.epidermidis* они составляют (2,1/1). Мы полагаем, это связано с тем, что резидентное носительство характеризуется внутриклеточным расположением возбудителя, что исключает его плотный контакт с иммунной системой и, как следствие – постоянной ее стимуляции.

Рассматривая персистенцию стафилококков в мужской репродуктивной системе, также был выявлен ряд особенностей интерлейкинового статуса спермы пациентов в зависимости от вида носительства (таблица 2).

Таблица 2

Уровень ИЛ 8 и ИЛ 10 в спермоплазме обследованных ($M \pm m$, пг/мл)

Вид носительства	Кол-во обследованных (n)	ИЛ 8	Достоверность различий с нормальными показателями	ИЛ 10	Достоверность различий с нормальными показателями
Не носители	50	82,4±2,27		0	
<i>S.aureus</i> резидентный	110	2520±12,56	<0,001	0	*
<i>S.aureus</i> транзиторный	110	578,0±4,30	<0,001	0	*
<i>S.epidermidis</i> резидентный	110	870,7±9,80	<0,001	1,4±0,021	<0,01
<i>S.epidermidis</i> транзиторный	110	1610,0±11,7	<0,001	2,40±0,03	<0,01

Нами установлено, что независимо от вида носительства, показатели ИЛ 8 превышали нормальные в десятки раз. Резидентное носительство *S.aureus* сопровождалось увеличением количества ИЛ 8 до 2520 пг/мл, что в 2,87 превышает аналогичный показатель при носительстве *S.epidermidis*, количество ИЛ 8 при котором составляло 870,7 пг/мл. При этом транзиторное носительство золотистого стафилококка вызывает меньшее повышение ИЛ 8 (578,0 пг/мл), чем эпидермального (1610,0 пг/мл).

В отношении ИЛ 10 мы выявили следующие закономерности: в сперме он был выявлен только у 22,2 % обследованных. При этом у не носителей он не встречался. У носителей *S.aureus* он также отсутствовал. В сперме резидентных носителей *S.epidermidis* ИЛ 10 был обнаружен в 20 % и составлял 1,4 пг/мл, а у транзиторных носителей ИЛ 10 присутствовал у 26,3 % и составлял 2,40 пг/мл.

Заключение

Сопоставляя полученные нами результаты, можно сделать вывод, что носительство эпидермального стафилококка носит более мягкий и предсказуемый характер. В ответ на внедрение чужеродного агента возникает достаточно сильный иммунный ответ, причем провоспалительная реакция уравнивается противовоспалительными механизмами. При переходе в стадию резервации (резидентное носительство) сила и амплитуда иммунных реакций снижается, что и позволяет возбудителю персистировать. *S.aureus* же поддерживает гиперэргический характер воспаления, даже переходя к внутриклеточному существованию. Возможно, это связано с отсутствием продукции ИЛ 10 и, как следствие, достаточной презентацией антигенного материала на поверхности макрофагов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РГНФ в рамках проведения научных исследований по проекту № 13-06-00008 «Повышение качества жизни больных хроническим простатитом: медицинский и социальный аспекты».

Список литературы

1. Бойко В.И., Кондрашова Ю.И., Бойко О.В. Доценко Ю.И., Алексашина Л.И., Журихин А.В. Методы комплексной оценки иммунного статуса работающего населения // Клиническая лабораторная диагностика. М., 2011. № 10. С. 5-6.
2. Бойко О.В. Терентьев А.А. Бойко В.И. Молекулярные механизмы бактерионосительства (Характеристика и подробный анализ). Palmarium academic publishing, Saarbrucken, Germany, 2012. 175 с.
3. Бойко О.В., Николаев А.А., Алексашина Л.И., Бойко В.И., Кондрашова Ю.В., Журихин А.В., Доценко Ю.И. Морфологические изменения семенной плазмы при носительстве различных видов стафилококков // Клиническая лабораторная диагностика. М., 2012. № 9. С. 80-81.
4. Бухарин О.В., Дерябин Д.Г. Экологическая детерминированность маркеров персистенции стафилококков // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1997. № 4. С. 60-63.

5. Фрейдлин И.С. Паракринные и аутокринные механизмы цитокиновой иммунорегуляции // Иммунология. 2001. № 5. С. 4-7.
6. Jinquan T., Larsen C. G., Gesser B. Human IL-10 is a chemoattractant for CD8+ T lymphocytes and an inhibitor of IL-8-induced CD4+ T lymphocyte migration. J Immunol. 1993 Nov 1; 151(9): 4545-51.
7. Hobbs K. Interleukin-10 and transforming growth factor- β promoter polymorphisms in allergies and asthma // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1998. Vol. 159. P.1958-1962.
8. Lu W., Pan K., Zhang L. Genetic polymorphisms of interleukin (IL)-1B, IL-1RN, IL-8, IL-10, and tumor necrosis factor {alpha} and risk of gastric cancer in a chinese population. Carcinogenesis. 2004 Dec 3.
9. Lyke K.E., Burjes R., Cissoko Y. Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1beta), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, and IL-12 (p 70) in Malian children with severe Plasmodium falciparum malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls. Infect Immun. 2004 Oct.; 72(10):5630-7.
10. Romagnoli C., Frezza S., Cingolani A. Plasma levels of interleukin-10 in preterm neonates evaluated for sepsis // Eur. J. Pediatr. 2001. Vol. 160, N. 6. P. 345-350.
11. Sibora J.P., Chlebna – Sokol D., Kizyzanska – Oberbek A. Proinflammatory cytokines (IL-6, IL-8), cytokine inhibitors (IL-6sR, sTNFRII) and anti-inflammatory cytokines (IL-10, IL-13) in the pathogenesis of sepsis in newborns and infants. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2001; 49(5): 399-404.

Рецензенты:

Николаев А.А., д.м.н., профессор, зав. кафедрой общей и биоорганической химии ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Астрахань.

Кривенцев Ю.А., д.м.н., доцент кафедры биохимии с курсом КЛД ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Астрахань.