

OCENA STEŻENIA IL-5 i IL-6 W TOKSOPLAZMOZIE

JOANNA MATOWICKA-KARNA, HALINA KEMONA I ANATOL PANASIUK*

Zakład Laboratoryjnej Diagnostyki Klinicznej, *Klinika Obserwacyjno-Zakaźna Akademii Medycznej, ul. J. Waszyngtona 15a, 15-274 Białystok; E-mail: matowic@amb.edu.pl

ABSTRACT. The evaluation of concentrations il-5 and il-6 in toxoplasmosis. The immune system, its cellular and humoral response, is engaged by the host organism to fight against parasitic invasions. The group examined consisted of 38 women aged 19-39 years infected with *Toxoplasma gondii*. The diagnosis was established basing on serologic examination. Blood for analysis was collected before antiparasitic treatment. Control group consisted of 40 healthy women aged 18-46 years. The concentrations of IgM, IgG and IgE were assayed using a set of VIDAS (bioMerieux) according to the ELFA method. The concentrations of IL-5, IL-6 were assayed using a set of Quantikine human (R&D Systems) according to the immunoenzymatic methods with labeled antibodies. The present study revealed that in toxoplasmosis the concentration of IgE, IL-5 and IL-6 contents in blood serum was 2-times higher, than in healthy controls.

Key words: IgE, IL-5, IL-6, *toxoplasmosis*.

WSTĘP

Toxoplasma gondii jest pasożytem kosmopolitycznym. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia około 1/3 ludności świata jest zarażona tym pierwotniakiem (Hill i Dubey 2002). Ocenia się, że 50-70% populacji osób dorosłych w Polsce miała kontakt z pasożytem, dlatego że występują u nich przeciwciała przeciwko temu pasożytowi (Bielawska i wsp. 1999). Natomiast toksoplazmoza wrodzona występuje w proporcji 1:1000 porodów (Rydzewski 1995, Nickdel i wsp. 2001). Na podstawie badań przeprowadzonych w latach 1990-2000 w regionie Poznania stwierdzono, że 43,7% kobiet w ciąży było zarażonych *T. gondii* (Pawłowski 2002).

Cechą charakterystyczną inwazji pasożytniczych jest zwiększona produkcja immunoglobuliny klasy IgE. Defekt ten wynika z zaburzenia regulacji produkcji przeciwciał przez limfocyty T pomocnicze. Zwiększenie produkcji IgE poprzez uwalnianie mediatorów z komórek tucznych ułatwia powstawanie miejscowego odczynu zapalnego oraz uczestniczy w reakcji cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał (ADCC) (Dessaint i Capron 1989, Ishikawa i wsp. 1998, Kasakura 1998, Souza-Atta i wsp. 1999).

Cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał jest głównym mechanizmem obronnym skierowanym przeciwko pasożytom, a komórkami efektorowymi są eozynofile. Zwiększenie produkcji eozynofilów jest spowodowane działaniem cytokin, m. in. IL-5 i IL-3 (Lorentz i wsp. 1999). Eozynofile posiadają na swojej powierzchni receptory FcR wiążące IgE i IgG, oraz uczestniczą w zabijaniu pasożytów opłaszczonych tymi przeciwciałami. Aktywność cytotoksyczna eozynofilów ulega zwiększeniu pod wpływem cytokin (TNF- α , IL-5) uwalnianych przez komórki tuczne, limfocyty i makrofagi (Kinet 1999). W przebiegu parazytoz nie dochodzi do ekspresji antygenów pasożyta na powierzchni komórek żywiciela, ale wyjątek stanowi *Toxoplasma gondii*. W przebiegu zarażenia *T. gondii* antygeny pasożyta pojawiają się na powierzchni komórek żywiciela. Wówczas komórki cytotoksyczne niszczą zarażone komórki, ale nie zabijają bezpośrednio pasożyta, ponieważ na powierzchni komórek żywiciela nie ma odpowiednich dla niego antygenów MHC.

IL-6 bierze udział w odpowiedzi immunologicznej, w reakcji zapalnej i w krwiotworzeniu. Jest jednym z czynników regulujących mechanizmy obronne ustroju.

Celem przeprowadzonych badań była ocena stężenia IgE, IL-5 oraz IL-6 u kobiet zarażonych *T. gondii*. Wykonane badania umożliwiają ocenę stopnia immunizacji i odpowiedzi zapalnej organizmu żywiciela po zarażeniu *T. gondii*.

MATERIAŁ I METODY

Badania wykonano u 38 kobiet (w wieku od 19 do 39 lat) zarażonych *T. gondii* przed leczeniem przeciwpasożytniczym. U wszystkich pacjentek (T) oznaczano metodą ELFA stężenia swoistych przeciwciał w klasach IgM i IgG, skierowanych przeciwko *T. gondii*. Do badań kwalifikowano chore, u których index IgM przekraczał 0,7 a stężenie IgG przekraczało 100 KIU/l (Dave i wsp. 1994). Grupę kontrolną (K) stanowiło 40 zdrowych kobiet w wieku od 18 do 46 lat. W grupie badanej (T) i grupie kontrolnej (K) wykonano oznaczenia stężenia IgE, IL-5 oraz IL-6.

Oznaczenie stężenia całkowitej IgE

Oznaczenie stężenia IgE metodą ELFA wykonywano na analizatorze immunoserologicznym VIDAS. W zestawie odczynnikowym znajduje się koniugat (monoklonalne mysie przeciwciało anti-IgE związane z fosfatazą alkaliczną), bufor płuczający i substrat. Zarówno próbą kontrolną jak i kalibratorem jest ludzka IgE połączona z końską surowicą i metakrezolem. Próg czułości metody wynosi 0,5 KIU/l.

Oznaczenie stężenia interleukiny 5 (IL-5)

Stężenie IL-5 oznaczano metodą ELISA w surowicy krwi za pomocą zestawu Quantikine human IL-5 firmy R&D. Zasada testu – specyficzne przeciwciała anti-IL-5, które opłaszczają ścianę studzienki w mikroplątce są wiązane przez IL-5 znajdującą się w badanej surowicy. W reakcji zachodzącej pomiędzy przeciwciałami a IL-5 otrzymuje się kompleksy immunologiczne typu „sandwich”. Ilość związa-

nych kompleksów jest miarą stężenia IL-5 w surowicy. Następnym etapem jest łączenie się kompleksów IL-5 z peroksydazą (POD). Aktywność związanej peroksydazy jest oznaczana fotometrycznie po dodaniu wody utlenionej i chromogenu. Odczytu absorbancji dokonywano przy długościach fali 450 nm i 540 nm. Z otrzymanej krzywej kalibracyjnej odczytywano wartości stężenia prób badanych. Próg czułości metody wynosi poniżej 3,0 pg/ml.

Oznaczanie stężenia interleukiny 6 (IL-6)

Stężenie IL-6 oznaczano metodą ELISA w surowicy krwi za pomocą zestawu Quantikine High Sensitivity human IL-6 firmy R&D. Zasada testu – specyficzne przeciwciała anty-IL-6, które opłaszczają ścianę studzienki w mikroplątce są wiązane przez IL-6 znajdującą się w badanej surowicy. W reakcji zachodzącej pomiędzy przeciwciałami a IL-6 otrzymuje się kompleksy immunologiczne typu „sandwich”. Ilość związanych kompleksów jest miarą stężenia IL-6 w surowicy. Następnym etapem jest łączenie się kompleksów IL-6 z fosfatazą alkaliczną. Aktywność związanej fosfatazy alkalicznej jest oznaczana fotometrycznie po dodaniu NADPH i mieszaniny diaforazy z solą tetrazolową. Odczytu absorbancji dokonywano przy długościach fali 490 nm i 650 nm. Z otrzymanej krzywej kalibracyjnej odczytywano wartości stężenia prób badanych. Próg czułości metody wynosi poniżej 0,094 pg/ml.

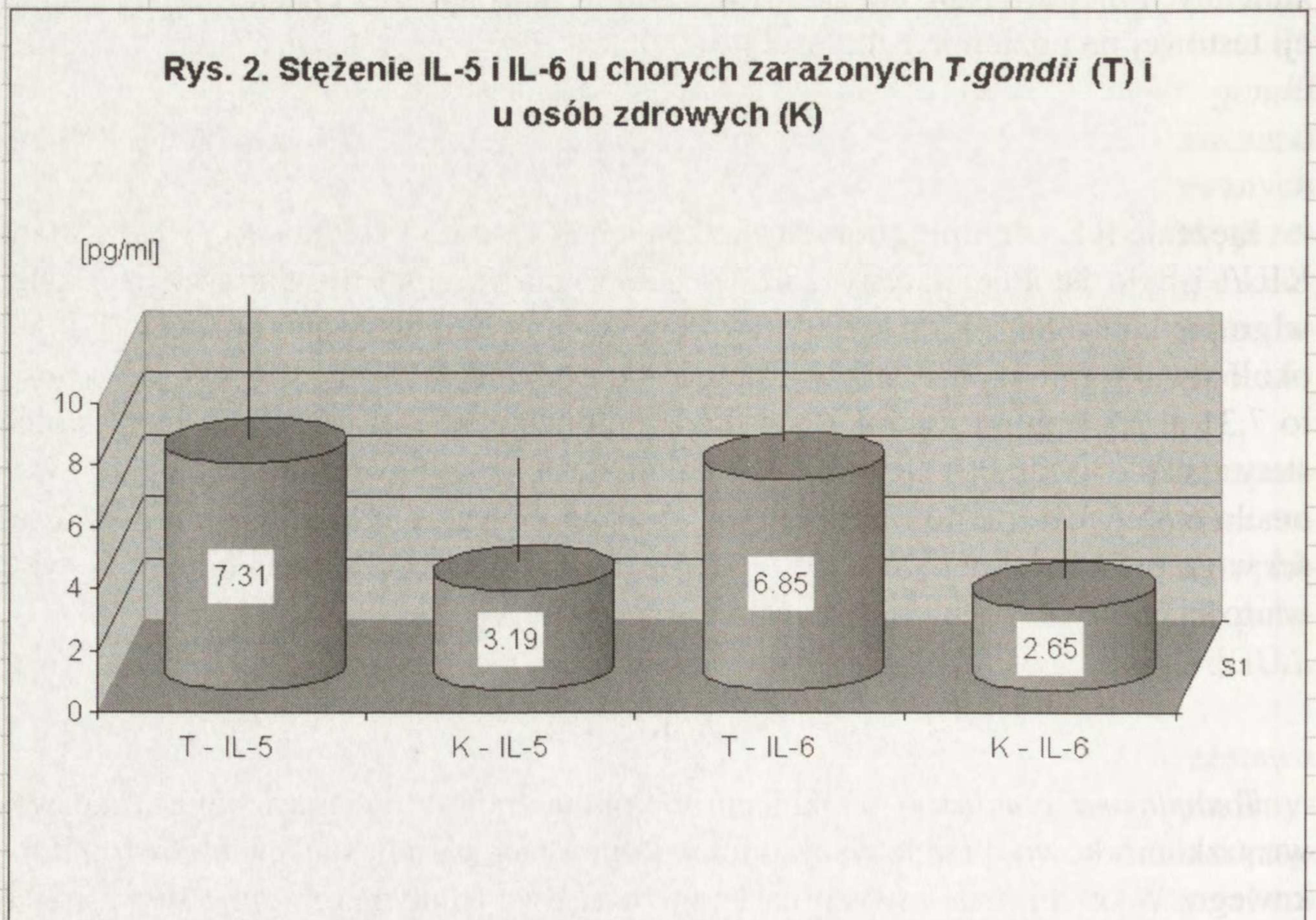
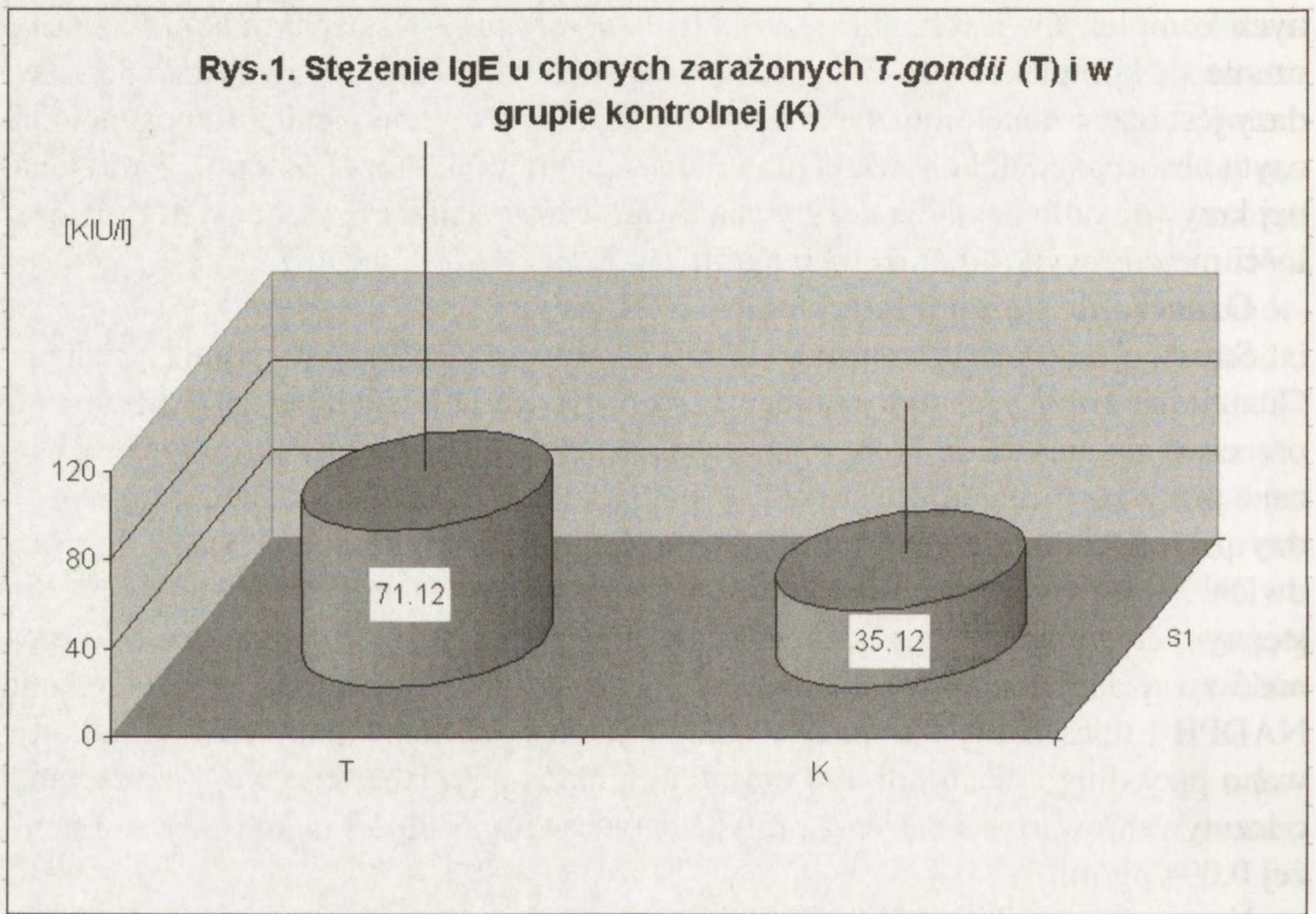
Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej stosując test t-Studenta dla zmiennych niepowiązanych. Za różnice istotne statystycznie uznano wartość funkcji testowej na poziomie istotności $p < 0,05$.

WYNIKI

Stężenie IgE w grupie chorych zarażonych *T. gondii* (T) wynosiło $71,12 \pm 98,40$ KIU/l i było istotnie statystycznie wyższe w porównaniu do wartości uzyskanej w grupie kontrolnej (K) $p < 0,05$ (Rys.1). Stężenie IL-5 w grupie badanej (T) było około dwukrotnie wyższe niż w grupie kontrolnej ($X=3,19 \pm 1,82$ pg/ml) i wynosiło $7,31 \pm 2,84$ pg/ml. Różnica uzyskana pomiędzy tymi wartościami była istotna statystycznie, $p < 0,001$ (Rys. 2). Natomiast stężenie IL-6 w grupie badanej (T) wynosiło 6,85 (3,10 pg/ml i było około 2,5-krotnie wyższe w porównaniu do wartości w grupie kontrolnej ($X= 2,65 \pm 1,14$ pg/ml). Różnica uzyskana pomiędzy tymi wartościami była istotna statystycznie, $p < 0,001$.

DYSKUSJA

Toxoplasma gondii po wniknięciu do organizmu człowieka namnaża się wewnątrzkomórkowo, przede wszystkim w komórkach układu siateczkowo-śródbłonkowego. W ostrej fazie inwazji następuje bardzo szybkie namnażanie się pasożyta (tachyzoitów) i powstają pseudocysty. Większość przypadków toksoplazmozy na-



bytej u osób immunokompetentnych przebiega bezobjawowo. Postać objawowa manifestuje się miejscowym powiększeniem węzłów chłonnych, głównie w obrębie głowy i szyi. Powiększeniu węzłów chłonnych towarzyszą bóle mięśniowe, łatwe męczenie się, osłabienie, nawracające bóle głowy oraz czasami bóle gardła (Dubey 1998).

W drugim tygodniu od zarażenia *T. gondii* pojawiają się we krwi przeciwciała IgM skierowane przeciwko pasożytowi. Miano przeciwciał osiąga maksimum pomiędzy 4 a 12 tygodniem od zarażenia, a czasami utrzymuje się przez okres kilku miesięcy. Przeciwciała IgE pojawiają się we krwi w tym samym czasie co IgM i nieznacznie wyprzedzają specyficzne przeciwciała IgA, ale nie występują w okresie powyżej 4 miesiąca od zarażenia (Paul 1997). Swoiste IgG pojawiają się po 2-4 tygodniach od zarażenia, a poziom ich narasta do 8 miesiąca inwazji *T. gondii* (Żarnowska-Prymek 1993, Sobieszkańska 2002).

W grupie kobiet zarażonych *T. gondii* stężenie przeciwciał IgE było znamienne wyższe niż u osób zdrowych oraz towarzyszył temu również wzrost stężenia przeciwciał IgM, dlatego należy sądzić, że mamy do czynienia z ostrą postacią inwazji. Ponieważ uzyskane wartości IgE są dwukrotnie wyższe niż te uzyskane w grupie zdrowych kobiet, wydaje się, że *T. gondii* stymuluje produkcję IgE. Stężenie przeciwciał IgE koreluje z wczesnym ostrym stanem lub reaktywną toksoplazmozą. Jednak, jak wykazały badania Grossa i wsp. (1997), negatywny wynik IgE nie wyklucza możliwości ostrej toksoplazmozy. Dziubek i wsp. (2001) oznaczali specyficzne przeciwciała skierowane przeciwko *T. gondii* (IgM, IgG, IgA) oraz subpopulację limfocytów CD4+ i CD8+ używając przeciwciał monoklonalnych. Stwierdzili, że wzrasta odsetek CD8+, a zmniejsza się odsetek limfocytów CD4+, co może być wynikiem supresyjnego działania pasożyta. Świadczy to również o zwiększeniu cytotoksyczności limfocytów w stosunku do pasożyta.

IL-5 przedłuża przeżycie dojrzałych eozynofili, stymuluje ich degranulację, działa chemotaktycznie na te komórki a także zwiększa wytwarzanie reaktywnych związków tlenowych (Faccioli i wsp. 1997, Rutkowski i Moniuszko 2001). Poglądy różnych autorów na udział IL-5 w zarażeniu *T. gondii* nie są jednorodne. Wyniki badań Nickdela i wsp. (2001) wskazują na negatywny wpływ IL-5 na wczesne stadium doustnego zarażenia przez *T. gondii*. Według tych autorów zwiększone stężenie IL-5 nasila zmiany zapalne jelita cienkiego, eozynofilię i powoduje zmniejszenie stężenia IL-12 i IFN- γ . Natomiast Zhang i Denkers (1999) w badaniach przeprowadzonych u myszy wykazali, że IL-5 pełni funkcję ochronną, zabezpieczającą przed inwazją *T. gondii*. Sugerują oni, że IL-5 odgrywa dużą rolę w produkcji IL-12 w przebiegu przewlekłej toksoplazmozy. W naszych badaniach wykazaliśmy dwukrotny wzrost stężenia IL-5 u osób zarażonych *T. gondii* w porównaniu do osób zdrowych. Wyniki tych badań mogą sugerować wzrost cytotoksyczności eozynofili w stosunku do pasożyta.

IL-6 charakteryzuje się wielokierunkowością oddziaływań i jest uznawana za jeden z centralnych czynników regulujących mechanizmy obronne (Rigano i wsp. 1996). IL-6 w swym oddziaływaniu na limfocyty B jest przede wszystkim czynnikiem stymulującym różnicowanie ich w kierunku komórek uwalniających immunoglobuliny, a szczególnie wrażliwe na jej działanie są limfocyty B, które zostały wcześniej pobudzone przez IL-5. Wyniki naszych badań wskazują na 2,5-krotny wzrost stężenia IL-6 w porównaniu do grupy kontrolnej. Zwiększone stężenie IL-6 u chorych zarażonych *T. gondii* może wskazywać na indukcję reakcji zapalnej, a także wzmoczoną odpowiedź immunologiczną, czego wyrazem jest również wzrost stężenia IgE. W badaniach naszych wykazaliśmy, że wzrost stężenia IL-6 koreluje ze wzrostem stężenia IgE. Wzrost stężenia specyficznych przeciwciał IgM i IgG skierowanych przeciwko *T. gondii*, a także zwiększone stężenia IgE, IL-5 i IL-6 wskazują na immunizację organizmu żywiciela i występowanie stanu zapalnego. Świadczy to o wyraźnym oddziaływaniu pasożyta na organizm żywiciela.

WNIOSKI

(1) U chorych zarażonych *Toxoplasma gondii*, wzrost stężenia IL-5 i IL-6, a także IgE wskazuje na ich udział w odpowiedzi immunologicznej organizmu żywiciela.

LITERATURA

- Bielawska M., Żarnowska H., Borkowski P.K. 1999. Najczęstsze odzwierzęce choroby pasożytnicze człowieka. *Postępy Nauk Medycznych* 12: 23-26.
- Dave J., Balfour A.H., Perkin J. 1994. Evaluation of the Vidas toxo competition assay for the detection of antibodies specific to *Toxoplasma gondii* in human sera. *Serodiagnostics and Immunotherapy of Infectious Diseases* 6: 41-46.
- Dessaint J.-P., Capron A. 1989. IgE and immune defense mechanism. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* 7: 105-122.
- Dubey J.P. 1998. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology* 28: 1019-1024.
- Dziubek Z., Żarnowska H., Basiak W., Górski A., Kajfasz P. 2001. Some aspects of immune response in toxoplasmosis. *Przegląd Epidemiologiczny* 55: 495-502.
- Faccioli L.H., Vargaftig B.B., Medeiros A., Malheiros A. 1997. Cytokines in the modulation of eosinophilia. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 92(suppl. II): 109-114.
- Gross U., Keksel O., Darde M.L. 1997. Value of detecting immunoglobulin E antibodies for the serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 4: 247-251.
- Hill D., Dubey J.P. 2002. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clinical Microbiology and Infection* 8: 634-640.
- Ishikawa N., Goyal P.K., Mahida Y.R., Li K.-F., Wakelin D. 1998. Early cytokine responses during intestinal parasitic infections. *Immunology* 93: 257-263.
- Kasakura S. 1998. A role for T-helper type 1 and type 2 cytokines in the pathogenesis of various human diseases. *Rinsho Byori* 46: 915-921.

- Kinet J.-P. 1999. The high-affinity IgE receptor (Fc ϵ RI) : from physiology to pathology. *Annual Review of Immunology* 17: 931-972.
- Lorentz A., Schwengberg S., Mierke C., Manns M.P., Bischoff S.C. 1999. Human intestinal mast cells produce IL-5 in vitro upon IgE receptor cross linking and in vivo the course of intestinal inflammatory disease. *European Journal of Immunology* 29: 1496-1503.
- Nickdel M.B., Roberts F., Brombacher F., Alexander J., Roberts C.W. 2001. Counter-protective role for interleukin-5 during acute *Toxoplasma gondii* infection. *Infection and Immunity* 69: 1044-1052.
- Paul M. 1997. Zastosowanie metody ISAGA w wykrywaniu swoistych przeciwciał IgM, IgA, IgE w nabytej i wrodzonej toksoplazmozie. *Wiadomości Parazytologiczne* 43: 39-42.
- Pawłowski Z.S. 2002. Toxoplasmosis in Poznan region, Poland 1990-2000. *Przegląd Epidemiologiczny* 56: 409-417.
- Rigano R., Profumo E., Tegii A., Siracusano A. 1996. Production of IL-5 and IL-6 by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with *Echinococcus granulosus* infection. *Clinical and Experimental Immunology* 105: 456-459.
- Rutkowski R., Moniuszko T. 2001. Cytokiny wpływające na alergiczny proces zapalny. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 55: 587-603.
- Rydzewski A. 1995. Bezpośrednie rozpoznawanie laboratoryjne toksoplazmozy. *Klinika Perinatologii i Ginekologii Supl.* 11: 75-81.
- Sobieszkańska B.M. 2002. Evaluation of the usefulness examination of IgG avidity for serodiagnosis of toxoplasmosis. *Polski Merkurusz Lekarski* 13: 111-115.
- Souza-Ata M.L.B., Araujo M., D'Oliveira Junior A., Ribeiro-de Jesus A., Almeida R.P, Atta A.M., Carvalho E.M. 1999. Detection of specific IgE antibodies in parasite diseases. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 32: 1101-1105.
- Zhang Y, Denkers E.Y. 1999. Protective role for interleukin-5 during chronic *Toxoplasma gondii* infection. *Infection and Immunity* 67: 4383-4392.
- Żarnowska-Prymek H. 1993. Toksoplazmoza: rutynowa diagnostyka laboratoryjna i jej interpretacja kliniczna. *Klinika* 2: 31-34.

Zaakceptowano do druku 14 czerwca 2004