

## OPEN ACCESS

DOI: 10.25040/ntsh2019.02.13

### Для листування:

м. Львів, вул. Пекарська, 69, 79010  
Е-пошта: ydmarta79@gmail.com

Стаття надійшла: 17.11.2019

Прийнята до друку: 17.12.2019

Опублікована онлайн: 26.01.2020



© Марта Ломіковська,  
Ірина Кріль,  
Галина Потьомкіна,  
Валентина Чопяк, 2019

### ORCID IDs

М.П. Ломіковська

<https://orcid.org/0000-0002-9850-069X>

І. Й. Кріль

<http://orcid.org/0000-0002-6728-5827>

Г.О. Потьомкіна

<https://orcid.org/0000-0003-0193-8394>

В. В. Чопяк

<http://orcid.org/0000-0003-3127-2028>

**Конфлікт інтересів:** дослідження проводили за відсутності будь-яких комерційних або фінансових відносин, які могли б розглядатися як потенційний конфлікт інтересів.

### Author Contributions:

Ідея: В. Чопяк

Виконання досліджень: М. Ломіковська,  
І. Кріль

Написання статті: І. Кріль, М. Ломіковська

Редагування: Г.Потьомкіна, В. Чопяк

Остаточне затвердження: В. Чопяк

## Цитокиновий профіль у пацієнтів з реактивним артритом, спричиненим *Chlamydia trachomatis* і вірусом Епштейна-Барра\*

Марта Ломіковська, Ірина Кріль, Галина Потьомкіна,  
Валентина Чопяк

Львівський національний медичний університет імені  
Данила Галицького, Львів, Україна

**Вступ.** Реактивний артрит – найпоширеніше захворювання суглобів серед осіб працездатного віку. Запальний процес виникає не лише у разі бактерійної інфекції (урогенітальній, кишковій чи респіраторній), але спричиняється і вірусами (віруси гепатиту, краснухи, герпесвіруси, особливо EBV та ін.).

**Мета.** Саме тому, метою нашого дослідження стало – дослідити рівень цитокинів (TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-23, INF- $\gamma$ , IL-10) у пацієнтів з реактивним артритом, спричиненими хламідійною та EBV-інфекцією.

**Методи.** Обстежено 97 хворих на РеА (28 хворих – з *C. Trachomatis*, 33 хворих – з EBV, 19 хворих – з подвійним інфікуванням EBV та *C. Trachomatis*, 17 – з тонзилогенною інфекцією). Концентрацію цитокинів IL-10, IL-17, IL-23, TNF- $\alpha$  та INF- $\gamma$  оцінювали у дублікатах сироваток крові методом проточної цитометрії, використовуючи магнітні мікросфери, кон'юговані з моноклональними антитілами, за допомогою платформи BioPlex 200 з HRF (Bio-Rad, США), використовуючи технологію Luminex xMAP® та відповідні спеціальні набори.

**Результати.** Ми виявили достовірне зростання концентрації TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-23 та INF- $\gamma$  і зниження концентрації IL-10 у всіх досліджуваних групах хворих у комбінованій інфекції EBV та *C. trachomatis*, при EBV, при *C. trachomatis*, при РеА, зумовленому тонзилогенною інфекцією порівняно з контрольною групою здорових пацієнтів.

**Висновки.** Оцінка рівня активності запального процесу за допомогою визначення концентрації цитокинів у хворих з РеА дає змогу прогнозувати в подальшому ризик розвитку ревматоїдного артриту чи іншої системної аутоімунної патології.

**Ключові слова:** реактивний артрит, *Chlamydia trachomatis*, вірус Епштейна-Барра, цитокини

\* Оприлюднено під час SMART LION 2019, 18-20 вересня, Львів

## Cytokine profile in patients with reactive arthritis caused by Epstein-Barr viral and Chlamydial trachomatis infections \*\*

Marta Lomikovska, Iryna Kril, Halyna Potomkina,  
Valentyna Chopyak

*Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine*

**Introduction.** Currently, reactive arthritis is the most common joint disorder among people of working age. The inflammatory process occurs not only as a result of bacterial infection (urogenital, intestinal or respiratory), but is also caused by viruses (viruses of hepatitis, rubella, herpesviruses, especially EBV, etc.).

**Methods.** 97 patients with ReA have been examined (28 patients with C. Trachomatis, 33 patients with EBV, 19 patients with combined EBV and C. Trachomatis infection, 17 patients ReA with induced by tonsillitis). The level of IL-10, IL-17, IL-23, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  cytokines has been evaluated in duplicates in blood serum by flow cytometry technique, using magnetic microspheres conjugated to monoclonal antibodies with the help of the BioPlex 200 platform with HRF (Bio-Rad, USA) using Luminex xMAP® technology and relevant special kits.

**Results.** We have found a significant increase in the level of TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-23 and INF- $\gamma$  and a decrease in the level of IL-10 in all study groups of patients with combined EBV and C. Trachomatis infection, EBV, C. Trachomatis, ReA induced by tonsillitis as compared with the control group of healthy patients.

**Conclusions.** Assessment of the inflammatory process activity level by determining the concentration of cytokines enables to predict the risk of rheumatoid arthritis or other systemic autoimmune pathology in the future.

**Keywords:** Reactive arthritis, *Chlamydia trachomatis*, Epstein-Barr virus, cytokines

OPEN ACCESS

DOI: 10.25040/ntsh2019.02.13

**For correspondence:**  
69, Pekarska St., Lviv, 79010  
E-пошта: ydmarta79@gmail.com

**Received:** Apr 13, 2019

**Accepted:** May 17, 2019

**Published online:** June 26, 2019



Marta Lomikovska,  
Iryna Kril,  
Halyna Potomkina,  
Valentyna Chopyak,  
2019

### ORCID IDs

Marta Lomikovska  
<https://orcid.org/0000-0002-9850-069X>  
Iryna Kril  
<http://orcid.org/0000-0002-6728-5827>  
Halyna Potomkina  
<https://orcid.org/0000-0003-0193-8394>  
Valentyna Chopyak  
<http://orcid.org/0000-0003-3127-2028>

**Disclosures.** No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author

### Author Contributions:

Conceptualization: V. Chopyak  
Investigation: M. Lomikovska, I. Kril  
Writing - original draft: M. Lomikovska  
Writing - review and editing: H. Potomkina,  
V. Chopyak

\*\* Presented on the lecture during SMART LION 2019, Lviv, September, 18-20, 2019



Рис. 1. Марта Ломніковська доповідає під час SMART LION 2019, (Львів, 2019)

Реактивний артрит (РеА) – найбільш розповсюджена ревматологічна хвороба з частим запальним процесом суглобів населення (рис. 1). Ураження суглобів при РеА розвивається внаслідок імунних порушень після перенесеної урогенітальної, кишкової, респіраторної та тонзилігенної інфекцій [1]. Сьогодні роль *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) у розвитку РеА не викликає сумнівів. *C. trachomatis* є облігатною внутрішньоклітинною бактерійною інвазією, що спричиняє потужну імунопатологічну відповідь. Проте особливу увагу в розвитку РеА приділяють ролі вірусної інфекції передусім Епштейна-Барр вірусу (EBV). Хвороби, спричинені EBV, є частими та здебільшого асимптоматичними, активують імунну систему на тлі періодичної реактивації вірусу, що може провокувати та посилити патологічний процес [2]. Важливу роль у розвитку РеА відіграють цитокіни, які регулюють розвиток захисних реакцій імунної системи шляхом формування запальної реакції у відповідь на проникнення в тканини патогенів, а також у відповідь на пошкодження тканин [3]. Прозапальні цитокіни відіграють вирішальну роль в ініціюванні РеА, яке виникає внаслідок нерегульованої самонаправленої імунної відповіді. Регулювання прозапальної активності цих цитокінів зазвичай забезпечується протизапальними та регуляторними ци-

токінами [4]. У пацієнтів з РеА спостерігається дисбаланс продукції цитокінів і у підсумку формується патологічна імунна відповідь [5].

### Матеріали та методи

Ми спостерігали 97 хворих на РеА (28 хворих – з *C. Trachomatis*, 33 хворих – з EBV, 19 хворих – з подвійним інфікуванням EBV та *C. Trachomatis*, 17– з тонзилігенною інфекцією), які перебували на амбулаторному лікуванні в Регіональному медичному центрі клінічної імунології та алергології та на стаціонарному лікуванні в ревматологічному відділенні Львівської обласної клінічної лікарні (дозвіл біоетичного комітету Львівського національного медичного університету №5 від 10.05.2016 р.). Серед 28 пацієнтів з РеА хламідійного генезу чоловіки становили 23 (82.1%), жінки – 4 (17.9%); середній вік –  $31 \pm 4.5$  років. Серед 33 хворих на РеА, спричинених EBV, чоловіки становили 19 (57.6%), жінки – 14 (42.4%); середній вік –  $26.5 \pm 7.4$  років. Серед 19 хворих на РеА з подвійним інфікуванням – EBV та *C. Trachomatis*, чоловіків – 10 (52.6%), жінок – 9 (47.4%); середній вік –  $39.5 \pm 9.4$  років. Серед 17 пацієнтів з РеА на ґрунті тонзилігенної інфекції було 11 жінок (64.7%) і 6 чоловіків (35.3%); середній вік –  $21 \pm 6.8$  років. Контрольну групу становили 20 практично здорових осіб відповідного віку та статі.

Верифікацію РеА проводили на підставі клінічних даних, лабораторних та інструментальних досліджень. Хворі на РеА відповідали діагностичним критеріям згідно з протоколом МОЗ України від 12.10.2006 року. EBV-інфекцію верифікували на підставі клініко-лабораторних, серологічних (ідентифікація специфічних IgM, IgG до різних антигенів EBV), молекулярно-генетичних (виявлення ДНК вірусу) досліджень. Для діагностики хламідійної інфекції досліджували наявність специфічних антитіл IgM, IgG, IgA до *C-Trachomatis* і ДНК бактерії. У всіх хворих провели бактеріологічні дослідження посіву з зіву для ідентифікації ймовірного інфікування бактерійними збудниками, які традиційно викликають тонзиліт (стрептококи, стафілококи тощо). Виявлення специфічних антитіл відбувалося методом імуноферментного аналізу з використанням тест-систем «Euroimmun» (Німеччина). ДНК EBV у сироватці крові, слині, зішкрябах слизової задньої стінки глотки та ДНК *C. Trachomatis* в

сироватці крові та урогенітальному зішкрябі визначали методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням діагностикуму «Ampli Sens» (РФ) на «Rotor Geen 6000» (Corbett Research, Австралія). Циркулюючі цитокіни оцінювали у дублікатах сироваток крові методом проточної цитометрії, використовуючи магнітні мікросфери, кон'юговані з моноклональними антитілами, за допомогою платформи BioPlex 200 з HRF (Bio-Rad, США), використовуючи технологію Luminex xMAP® та відповідні спеціальні набори, що дають змогу одночасно вимірювати TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-23, INF- $\gamma$ , IL-10. Стандартні криві були зображені за допомогою логістичної регресії 4- або 5-PL. Отримані дані проаналізували за допомогою програмного забезпечення BioPlex Manager 6.0 (Bio-Rad, США) [6].

Статистичний аналіз проводили за допомогою програм Statistica 6.0.

### Результати і обговорення

Рівень концентрації досліджуваних цитокінів зображено на рис. 2. Порівняно з контрольною групою здорових осіб ми виявили зростання рівня TNF- $\alpha$  у всіх дослідних групах практично удвічі: при комбінованій інфекції EBV та *C. trachomatis* ( $17.9 \pm 2.39$  пг/мл,  $P < 0.05$ ), при EBV ( $18.9 \pm 2.51$  пг/мл,  $P < 0.05$ ), при *C. trachomatis* ( $18.1 \pm 2.67$  пг/мл,  $P < 0.05$ ), при ReA, спричиненому тонзилогенною інфекцією ( $20.3 \pm 2.21$  пг/мл,  $P < 0.05$ ).

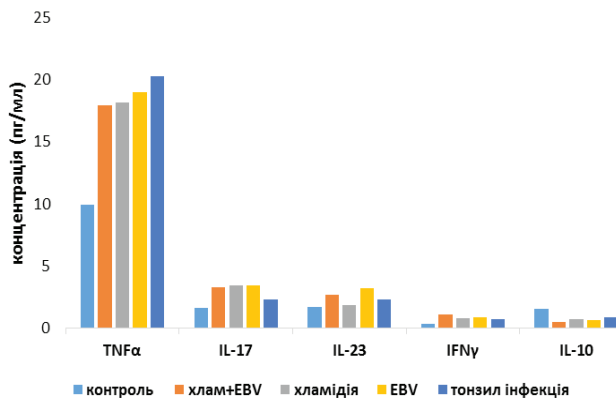


Рис. 2. Концентрація TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-23, IFN- $\gamma$  та IL-10 у пацієнтів з реактивним артритом, спричиненим *Chlamydia trachomatis* і вірусом Епштейна-Барр

Рівень IL-17 достовірно зростав у всіх групах хворих: у разі комбінованої інфекції EBV та *C. trachomatis* ( $3.25 \pm 0.79$  пг/мл), при

EBV ( $3.42 \pm 0.81$  пг/мл), при *C. trachomatis* ( $3.41 \pm 0.64$  пг/мл), при ReA, спричиненому тонзилогенною інфекцією ( $2.32 \pm 0.21$  пг/мл) пацієнтів ( $1.65 \pm 0.12$  пг/мл,  $P < 0.05$ ) порівняно з контрольною групою здорових осіб. Як видно з рис., рівень IL-23 збільшився в усіх дослідних групах хворих на ReA при комбінованій інфекції EBV та *C. trachomatis* ( $2.68 \pm 0.22$  пг/мл), при EBV ( $3.17 \pm 0.43$  пг/мл), на ґрунті тонзилогенної інфекції ( $2.33 \pm 0.17$  пг/мл) порівняно з контрольною групою здорових осіб ( $1.74 \pm 0.22$  пг/мл,  $P < 0.05$ ). Також ми виявили (порівняно з контрольною групою здорових осіб) значне зростання рівня IFN- $\gamma$  у всіх дослідних групах: при EBV - в 2.4 раза, при *C. trachomatis* - в 2.1 раза, при ReA, викликаному тонзилогенною інфекцією в 1.9 раза та особливо при комбінованому інфікуванні EBV та *C. trachomatis* втричі. Натомість рівень IL-10 порівняно з контрольною групою здорових пацієнтів виявився нижчим у всіх пацієнтів дослідних груп: при комбінованій інфекції EBV та *C. trachomatis* в 3.4 раза, при EBV в 2.5 раза, при *C. trachomatis* в 2.3 раза, при ReA, викликаному тонзилогенною інфекцією в 1.8 раза.

Як відомо, рівень TNF- $\alpha$  підвищується при різних неспецифічних та інфекційних запальних станах. У літературі описано, що на початку ReA може спостерігатись низька продукція TNF- $\alpha$  в периферичній крові [4]. Низька концентрація TNF- $\alpha$  відіграє ключову роль у розвитку ReA, оскільки дефіцит продукції TNF- $\alpha$  може пригнітити елімінацію інфекційних агентів, що призводить до персистенції збудника на ранніх стадіях хвороби. Проте, з іншого боку TNF- $\alpha$  відіграє патологічну роль під час хронічної стадії ReA. У деяких дослідженнях виявили значне зростання продукції TNF- $\alpha$  при хронічному ReA [5]. Відомо, що TNF- $\alpha$  - найважливіший цитокін, який бере участь у розвитку запального процесу і при ревматоїдному артриті (РА). Зазначені дані підтверджують думку про можливість ефективного лікування хронічної фази ReA з використанням моноклональних антитіл анти-TNF- $\alpha$ , як це проводять при РА [5]. Крім того, ймовірність такого підходу до лікування підтверджується іншими дослідженнями, які засвідчують, що при ReA CD4+ клітини демонструють Th1 профіль з більшою продукцією TNF- $\alpha$ , сприяючи патогенезу захворювання через індукцію прозапальних цитокінів [6].

Збільшення рівня прозапального цитокіну IL-17 у дослідних групах хворих свідчить, що цей інтерлейкін відіграє важливу роль у патогенезі ReA. IL-17 сприяє розвитку багатьох запальних та аутоімунних хвороб [7]. Дослідження виявило, що в пацієнтів із ReA, спричиненим *S. Trachomatis*, спостерігається підвищена концентрація IL-17 в синовіальній рідині [5]. У літературі описано, що рівень IL-17 позитивно корелює з деструкцією колагену, збільшує ресорбцію кісток за рахунок остеокластогенезу, знищує хрящ людини, а також активує синовіальні фібробласти для продукції прозапальних цитокінів [8]. IL-17 синергічно з іншими прозапальними цитокінами може зумовити деструкцію протеоглікану хряща та розпад колагену. У відповідь на антигени бактерійних чи вірусних інфекцій, що ініціюють хронічне запалення IL-17 через Th17 клітини, активує систему IL-23, яка є ключовим учасником центральної регуляції клітинних механізмів запалення. Підвищений рівень IL-17, виявлений у синовіальній рідині та сироватці пацієнтів з ReA, може свідчити про активність IL-23. Останні дані засвідчують домінуючу роль IL-23, що контролює запалення в периферичних тканинах і суглобах [9]. Крім того, IL-23 продукується макрофагами й активованими дендритними клітинами та відіграє вирішальну роль у генерації Th17 клітин. У літературі описано, що рівень IL-23 у сироватці та синовіальній рідині позитивно корелює не тільки з IL-17, а й з IL-1b та TNF- $\alpha$ , що свідчить про тісний зв'язок синтезу IL-23 з продукцією інших прозапальних і протизапальних цитокінів при RA.

Для посилення Th1-відповіді IL-23 та IFN- $\gamma$  координуються між собою для розпізнавання збудника клітинами вродженого імунітету й індукції специфічного імунітету [10]. Крім того, підвищений рівень IFN- $\gamma$  може регулювати запалення, зумовлене – Th17лімфоцитами, оскільки ці клітини інгібуються IFN- $\gamma$  [11]. Дослідження виявило, що у пацієнтів із ReA, спричиненим *S. Trachomatis* концентрація IFN- $\gamma$  у синовіальній рідині була значно вищою, ніж у пацієнтів з остеоартрозом (OA), однак без суттєвих відмінностей між ReA та RA пацієнтами [12]. Проте кількість IFN- $\gamma$  позитивних CD3 + клітин була значно вищою в периферичній крові та синовіальній рідині хворих на хронічний ReA. Збільшення рівня IFN- $\gamma$  у дослідних групах хворих особливо

при комбінованій інфекції в наших дослідженнях свідчить про те, що IFN- $\gamma$  спочатку виконує істотну захисну та імунорегуляторну роль при розвитку ReA [13]. Однак надалі компенсаторне збільшення цього цитокіну, як і при RA, може сприяти посиленню патологічного запального процесу.

Баланс протизапальних і прозапальних цитокінів у синовіальній рідині та сироватці крові у хворих на ReA виявився дуже важливим. IL-10 – протизапальний цитокін, що відіграє головну роль у запобіганні запальних та аутоімунних патологій [14]. На підставі великої кількості досліджень T-клітини вважають основним джерелом IL-10, який пригнічує прозапальні функції антиген-презентуючих клітин (АПК) і виділення прозапальних цитокінів. Крім блокування дозрівання АПК IL-10, посилює їхню здатність поглинати антигени з одночасною затримкою їхньої міграції у лімфатичні вузли. Якщо патоген не нейтралізувався під час ранньої відповіді, то запальний процес прогресує, даючи додаткові сигнали, які сприяють подальшому дозріванню АПК і залученню адаптивних імунологічних ефектів. IL-10, який секретується CD4+T-клітинами, має подібні ефекти у пізній фазі імунної відповіді, знижуючи вираженість запальної реакції за допомогою сильних антиген-специфічних ефекторних механізмів, зменшуючи прозапальний стимул, який індукується патогеном. Дослідження виявили, що IL-10, гальмуючи виробництво прозапальних цитокінів і хемокінів, інгібує проліферацію CD4 + T-клітин, що може обмежити специфічну імунну відповідь і запалення [15]. Тому виявлене нами зниження рівня IL-10 може сприяти посиленню запалення і стати підґрунтям трансформації в аутоімунний процес.

Отже, підсумовуючи результати нашої роботи, можна зробити висновки, що цитокіни TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-23, INF- $\gamma$  та IL-10 відіграють важливу роль у розвитку ReA, спричиненого окремими інфекціями EBV чи *S. Trachomatis*, й особливо при їх комбінації. Подальше вивчення їхнього рівня в різних стадіях захворювання допоможе визначити ступінь активності запального процесу та прогнозувати ризик розвитку ревматоїдного артрити чи іншої системної аутоімунної патології.

## Література/References

1. Spaska GO. Clinical and epidemiological analysis hospitalization indicators Ministry's of Defense of Ukraine servicemen with reactive arthritis. *Lik Sprava* 2011; 3-4:143-9.
2. Posnett DN, Yarilin D. Amplification of autoimmune disease by infection *Arthritis Res Ther* 2005; 7: 74-84.
3. Driyanska VE, Drannik GN, Gaisenuk FZ. et al. Positive effects of modern immunocorrection according to the analysis of cytokines and SLPI in patients with pyelonephritis. *Lik Sprava* 2014; 12:45-56.
4. Kim T-H, Uhm W-S and Inman R D. Pathogenesis of ankylosing spondylitis and reactive arthritis *Curr Opin Rheumatology* 2005; 17:400-405.
5. Eliçabe R J, Di Genaro M S. Immunopathogenesis of reactive arthritis: Role of the cytokines *World J Immunol* 2014; July 27; 4(2): 78-87.
6. Krzystek-Korpacka M., Diakowska D., Neubauer K., Gamian A. Circulating midkine in malignant and non-malignant colorectal diseases. *Cytokine*, 2013; 64:158-164.
7. Robert M and Miossec P. IL-17 in Rheumatoid Arthritis and Precision Medicine: From Synovitis Expression to Circulating Bioactive Levels. *Front Med (Lausanne)* 2018;5: 364.
8. Lee Y. The role of interleukin-17 in bone metabolism and inflammatory skeletal diseases *BMB Rep.* 2013; Oct; 46(10): 479-483.
9. Tang C, Chen S, Qian H, et al. Interleukin-23: as a drug target for autoimmune inflammatory diseases. *Blackwell Publishing Ltd, Immunology*, 2011; 135: 112-124.
10. Hickman-Brecks CL, Racz JL, Meyer DM, LaBranche TP, Allen PM. Th17 cells can provide B cell help in autoantibody induced arthritis. *J Autoimmun*; 2011; 36: 65-75.
11. Singh R, Singh A, Aggarwal A, Aggarwal R, Misra R. Th1/Th17 cytokine profiles in patients with reactive arthritis/undifferentiated spondyloarthropathy. *J Rheumatol.* 2007; 34(11):2285-90.
12. Bas S, Neff L, Viatte S, Vuillet M, Spenato U, Guerne PA, Michel M, Tiercy JM, Butrimiene I, Gabay C. Relationship between gamma-interferon and interleukin-17 in *Chlamydia trachomatis* reactive arthritis. *Clin Exp Rheumatol*; 2009; 27: 885-886.
13. Eliçabe RJ, Cargnelutti E, Serer MI, Stege PW, Valdez SR, Toscano MA et al. Lack of TNFR p55 results in heightened expression of IFN- $\gamma$  and IL-17 during the development of reactive arthritis. *J Immunol* 2010\$ 185: 4485-4495.
14. O'Garra A, Barrat FJ, Castro AG, Vicari A, Hawrylowicz C. Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. *Immunol Rev* 2008\$ 223: 114-131.
15. Chuklin SM, Pereiaslov AA, Posivnych MM. Pathogenesis and treatment of hemocoagulation disorders in an acute necrotic pancreatitis. *Klin Khir.* 2006;10:26-9.