Echinococcus spp.–ээр халдварласан шинжлүүлэгчдийн ийлдсэнд IL-6, IFN-γ цитокин тодорхойлсон дүн

З.Амарбаясгалан[1], Б.Өлзийсайхан[2], Б.Агарзандан[1], Б.Хулан[3], Т.Мөнгөнзаяа[1], М.Бүрнээ[1], Н.Гиймаа[1], М.Наранхажид[1], С.Чимидцэрэн[2], А.Гүрбадам[1], Д.Тэмүүлэн[1]

[1]АШУҮИС, Био-Анагаахын сургууль, Биологийн тэнхим
[2]АШУҮИС, Био-Анагаахын сургууль, Дархлаа судлалын тэнхим
[3]АШУҮИС, Био-Анагаахын сургууль, Гистологийн тэнхим
Цахим шуудан: amarbayasgalan@mnums.edu.mn, Утас: 99556520

Түлхүүр үг:

Моноклон эсрэгбие
Метацестод
Стандарт муруй
Уйланхай

Товч утга:

Үндэслэл: *Echinococcus* spp. – ийн халдварын үед IL-6 болон IFN-γ, IL-17A цитокинуудын нийлэгжилт нэмэгддэг нь шимэгчийн эсрэг эзний дархлааны хариу урвалд чухал үүрэгтэйг илтгэдэг. Эдгээр цитокинуудын индукцийн эрчим нь өвчний клиник үе шат, уйланхайн байршил зэрэгтэй хамааралтай болохыг харуулсан үр дүнгүүд нийтлэгдсэн байна. **Зорилго:** Echinococcus-аар халдварласан шинжлүүлэгчдийн ийлдэс дэх IL-6, IFN-γ цитокины хэмжээг тодорхойлон, харьцуулан судлах **Арга, аргачлал:** Энэхүү судалгааг тохиолдол-хяналтын судалгааны загвар ашиглан хийж гүйцэтгэв. Судалгаанд нийт 98 шинжлүүлэгч хамрагдсанаас 56 хяналтын бүлэг, 42 тохиолдлын бүлгийнх байв. Судалгаанд R&D компан (Canad)-ы моноклон эсрэгбие болон хоёрдогч эсрэгбие зэрэг бусад ФХЭБУ-ын цомгийн бүрдэл хэсгүүдийг ашиглав. **Үр дүн:** Эрүүл хяналтын бүлгийн ийлдэс дэх IL-6 цитокины хэмжээ 3.42±7.14 pg/ml тодорхойлогдсон бол тохиолдлын бүлэгт 178.84±262.65 pg/ml тодорхойлогдов. IFN-γ цитокины хэмжээ эрүүл хяналтын бүлэгт 6.13±16.5 pg/ml байсан бол тохиолдлын бүлэгт 182.04±473.06 pg/ml тодорхойлогдсон бөгөөд статистик ач холбогдол бүхий ялгаа (P<0.0001)-тай байна. IFN-γ цитокины ийлдэс дэх хэмжээ нь эрүүл хяналтын бүлгээс Echinococcus spp. –ээр халдварласан буюу тохиолдлын бүлэгт статистик ач холбогдол бүхий ялгаа (P=0.0032)-тай байна. **Дүгнэлт:** *Echinococcus* spp. –ээр халдварласан шинжлүүлэгчдийн ийлдсэнд IL-6, IFN-γ цитокины хэмжээ эрүүл хяналтын бүлэгтэй харьцуулахад статистик ач холбогдол бүхий ялгаатай ажиглагдаж байна.

Үндэслэл: Echinococcosis нь *Echinococcus* төрлийн туузан хорхойн авгалдайгаар үүсгэгддэг зоонозын өвчин юм.[1] *Echinococcus* spp. –ээр халдварласан үед эсийн болон шингэний дархлаа өдөөгдөн (Rigano et al), IL-6 болон IFN-γ, IL-17A цитокинуудын нийлэгжилт нэмэгддэг нь шимэгчийн эсрэг эзний дархлааны хариу урвалд чухал үүрэгтэйг харуулдаг. Тухайлбал: Хулганыг *E.granulosus-ийн* авгалдайгаар зориуд халдварлуулсан тохиолдолд метацестодын өсөлтийн эхний үе шатанд IL-10, Th2 цитокинууд давамгайлж, улмаар Th1-ээр солигддог.[2-5] Гэсэн хэдий ч метацестодын хожуу үе шатанд Th1, Th2 эсүүд үрэвслийн эсрэг цитокинуудийг ялгаруулдаг. *Echinococcus*-ийн халдварын тохиолдлын 25%-д бэтгийн халдвар дахих магадлалтай байдаг бөгөөд дахисан бэтэгтэй шинжлүүлэгчдэд эмчилгээний дараа Th1 (IFN-γ) болон Th2 (IL-4, IL-10) цитокинууд нэмэгдсэн байдаг.[6]

Уйланхайтай шинжлүүлэгчдийн 82%-д IL-4, 74%-д IL-10, 50%-д IFN-γ тодорхойлогдсон хэмээн Zang (2008) нар тэмдэглэсэн. Эдгээр цитокинуудын индукцийн эрчим нь өвчний клиник үе шат, уйланхайн байршил зэрэгтэй хамааралтай болохыг харуулсан үр дүнгүүд нийтлэгдсэн байна[5]. Дээрх судалгааны үр дүнгээс үзэхэд *Echinococcus*-ийн халдварын үед ийлдэс дэх цитокинуудийн хэмжээг тодорхойлох

нь өвчний явц болон эмчилгээний үр дүнг үнэлэх нь чухал ач холбогдолтой байна.

Зорилго: *Echinococcus*-аар халдварласан шинжлүүлэгчдийн ийлдэс дэх IL-6, IFN-γ цитокины хэмжээг тодорхойлон, харьцуулан судлах

Арга, аргачлал: Бид энэхүү судалгаагаа тохиолдол-хяналтын судалгааны загвар ашиглан хийж гүйцэтгэв. Судалгааны ажил хийх Био-Анагаахын ёс зүйн зөвшөөрлийг АШУҮИС-ийн Био-Анагаахын ёс зүйн хорооны 2019 оны 11–р сарын 15–ны өдрийн хурлаар олгосон. (Проткол №2019/3-11) Судалгаанд R&D компан (Canad)-ы ФХЭБУ-ын цомгийн бүрдэл хэсгүүдийг ашиглав. Хүний IL-6, IFN-γ цитокиныг холбох моноклон эсрэгбиеийг 2мг/мл концентрациар шингэрүүлж, pH7.2-7.4 бүхий бэхлэгч уусмалд 12 цаг инкубаци хийн урвалын самбарт бэхлэв. Урвалын самбарын гадаргуугийн өвөрмөц бус хэсгийг саатуулах зорилгоор 1%-ийн BSA (үхрийн ийлдэсийн альбумин) ашиглав.

Стандарт уусмалыг 7.81-2000 pg/ml хүртэл шингэрүүлж, хоёрдогч эсрэгбиеийг 75ng/ml концентрациар, стрептавидин-HRP 40 дахин шингэрүүлж хэрэглэсэн бөгөөд субстрат уусмалаар тетраметилбензидин ашигласан. Үр дүнг үнэлэхдээ 450 нм долгионы уртад гэрлийн шингээлтийн утгыг хэмжин стандарт муруйг байгуулан регресс тэгшитгэлийг тооцсон. Статистик боловсруулалтыг Exel болон SPSS програмыг ашиглан хийж гүйцэтгэв. Тоон үзүүлэлтийг, дундаж утга, стандарт хазайлтын хэлбэрээр авч, бүлэг хоорондын ялгааг Т-тестийн ашиглан хамаарлыг тооцож P утга 0.05 бага байх тохиолдолд ялгааг статистикийн үнэн магадлалтай гэж үзсэн.

Үр дүн: Судалгаанд нийт 98 шинжлүүлэгч хамрагдсанаас 56 хяналтын бүлэг, 42 тохиолдлын бүлгийнх байв. Судалгаанд оролцож буй шинжлүүлэгчдийг *Echinococcus* spp. –ээр халдварласан эсэхийг дүрс оношилгоо болон ийлдэс судлалын шинжилгээгээр баталгаажуулсан.

Хүснэгт 1. IL-6 цитокин тодорхойлсон ФХЭБУ-ын стандарт муруй

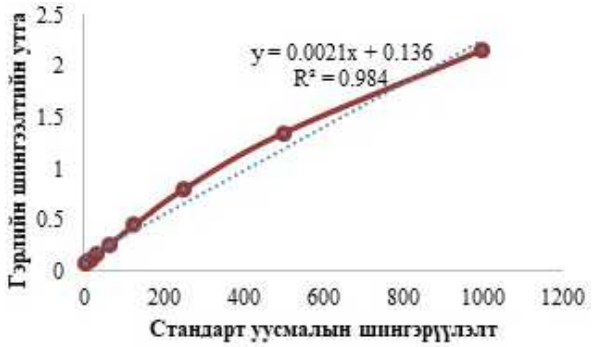
№	Стандарт уусмалын шингэрүүлэлт (pg/ml)	OD (nm)
1	1000	2.156
2	500	1.349
3	250	0.802
4	125	0.450
5	62.5	0.262
6	31.25	0.166
7	15.6	0.109
8	7.81	0.098
9	3.9	0.084
	Илрүүлэх доод хязгаар	185.4 pg/ml
	Илрүүлэх дээд хязгаар	1000 pg/ml

IL-6 цитокин тодорхойлох ФХЭБУ-ын стандарт уусмалыг 3.9-1000 pg/ml шингэрүүлэв. IL-6 цитокин тодорхойлох ФХЭБУ-ын илрүүлэх доод хязгаар 185.4 pg/ml, илрүүлэх дээд хязгаар 1000 pg/ml байв. (Хүснэгт 1.)

Хүснэгт 2. IFN-γ цитокин тодорхойлсон ФХЭБУ-ын стандарт муруй

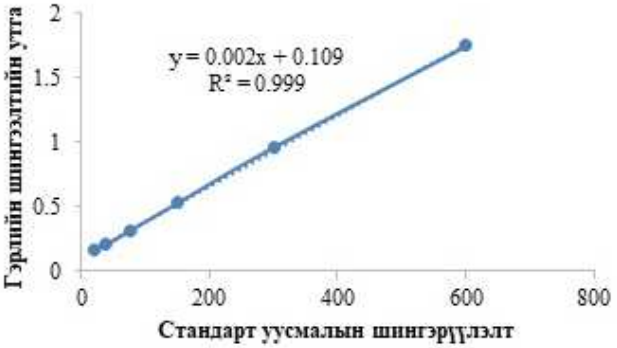
№	Стандарт уусмалын шингэрүүлэлт (pg/ml)	OD (nm)
1	600	1.745
2	300	0.96
3	150	0.528
4	75	0.312
5	37.5	0.2
6	18.75	0.158
	Илрүүлэх доод хязгаар	11.36 pg/ml
	Илрүүлэх дээд хязгаар	600 pg/ml

IFN-γ цитокин тодорхойлох ФХЭБУ-ын стандарт уусмалыг 18.75-600 pg/ml хооронд шингэрүүлэв. IFN-γ цитокин тодорхойлох ФХЭБУ-ын илрүүлэх доод хязгаар 11.36 pg/ml, илрүүлэх дээд хязгаар 600 pg/ml байв. (Хүснэгт 2.)



Зураг 1. IL-6 цитокин тодорхойсон ФХЭБУ-ын стандарт муруй

IL-6 цитокин тодорхойлсон ФХЭБУ-ын стандарт муруй регрессийн тэгшитгэлийн үнэмшилт утга R^2=0.984 байв. (Зураг 1.)



Зураг 2. IFN-γ цитокин тодорхойлсон ФХЭБУ-ын стандарт муруй

IFN-γ цитокин тодорхойлсон ФХЭБУ-ын стандарт муруй регресс тэгшитгэлийн үнэмшилд утга R^2=0.9994 байв. (Зураг 2.)

Эрүүл хяналтын бүлгийн ийлдэс дэх IL-6 цитокины хэмжээ 3.42±7.14 pg/ml, харин тохиолдлын бүлэгт 178.84±262.65 pg/ml тодорхойлогдов.

IFN-γ цитокины хэмжээ эрүүл хяналтын бүлэгт 6.13±16.5 pg/ml байсан бол тохиолдлын бүлэгт 182.04±473.06 pg/ml байв. (Хүснэгт 3.)

Хүснэгт 3. Тохиолдын болон хяналтын бүлэг дэх цитокины хэмжээ

	Echinococcus IgG	IL-6 (pg/ml)	IFN-γ (pg/ml)
Хяналтын бүлэг n=56	-	3.42±7.14	6.13±16.5
Тохиолдлын бүлэг n=42	+	178.84±262.65	182.04±473.06

IL-6 цитокины ийлдэс дэх хэмжээ тохиолдлын бүлэгт 3.42±7.14 pg/ml, эрүүл хяналтын бүлэгт 178.84±262.65 pg/ml тодорхойлогдож, статистик ач холбогдол бүхий ялгаа(P<0.0001) илэрлээ. IL-6 цитокины ийлдэс дэх хэмжээ тохиолдлын бүлэг (3.42±7.14 pg/ml)-т эрүүл хяналтын бүлэг (178.84±262.65 pg/ml)—т статистик ач холбогдол бүхий ялгаатай байв. (P<0.0001)

IFN-γ цитокины ийлдэс дэх хэмжээ нь эрүүл хяналтын бүлгээс *Echinococcus* spp. –ээр халдварласан буюу тохиолдлын бүлэгт өндөр байгаа нь статистик ач холбогдол бүхий ялгаатай байв. (P=0.0032).

Хэлцэмж: Бидний судалгаагаар *Echinococcus* spp. –ээр халдварласан шинжлүүлэгчдийн ийлдэс дэх IL-6 (178.84±262.65 pg/ml), болон IFN-γ (182.04±473.06 pg/ml) цитокины хэмжээ өндөр тодорхойлогдов. Dalila (2012) нарын *Echinococcus* spp.-ээр халдварласан элэгний уйланхайтай өвчтөнүүдэд хийсэн судалгааны үр дүнгээс үзэхэд хяналтын бүлэгт IL-6 цитокины түвшин 6.32±3.11 pg/ml, тохиолдлын бүлэгт 145.25±24 pg/ml тодорхойлогдсон буюу статистик ач холбогдол бүхий ялгаатай байсан байна. (P<0.0001) IFN-γ цитокины хэмжээ эрүүл хяналтын бүлэгт 2.05±0.83 IU/ml, тохиолдлын бүлэгт 18.99±3.21 IU/ml байсан нь бидний судалгааны үр дүнтэй дүйж байна.[7] Dalila Mezioug (2012) нарын судалгаанаас харахад мэс заслын эмчилгээний дараа ийлдэс дэх цитокины хэмжээ буурч байгаа нь ажиглагдсан. Үүнээс дүгнэхэд бэтэгний уйланхайн эсрэг IL-6, IFN-γ цитокины үүрэг чухал нөлөөтэйг харуулж байна. Нэлээд хэдэн шимэгчийн халдварын үед тухайлбал *Plasmodium, Leishmania* зэрэг үүсгэгчдээр халдварласан шинжлүүлэгчдийн ийлдсэнд IL-6, IFN-γ хэмжээ ихэссэн байна.[8-10] Мөн вирусын халдвар, аутоиммуны өвчнүүд, архаг үрэвсэлт өвчнүүд, лимфоид хавдар, полисахарид агуулсан эмгэгтөрөгчдийн халдварын үед ийлдэс дэх IL-6 нэмэгддэг.[9-11]

Sara (нар)-ын Алжерт (2021) хийсэн судалгааны үр дүнгээс үзэхэд *Echinococcus*-аар халдварласан шинжлүүлэгчдэд IL-17A нийлэгжилт өндөр байх бөгөөд үүнтэй уялдан IL-6, IFN-γ нийлэгжилт уйланхайн байршил, клиник үе шат, шимэгчийн антигений эсрэг дархлааны хариу урвал, шинжлүүлэгчдийн прогнозод зэргээс хамааран өөр өөр байжээ.[12]

Xiumin (2014) нар IL-17A болон IFN-γ нь *E.granulosus*-ийн халдварын эсрэг чухал хамгаалах үүрэгтэй хэмээн онцлон тэмдэглэсэн байна. Олон судлаачид дээрх үр дүнгүүд нь *E.granulosus*-ийн эндемик орнуудад халдварлагчдыг үхэлд хүргэдэг хор хөнөөлөөс урьдчилан сэргийлэх шинэ стратеги хөгжүүлэхэд түлхэц болно гэж үзэж байна.

Дүгнэлт:

1. Судалгаанд хамрагдсан шинжлүүлэгчдийн ийлдэс дэх IL-6 хяналтын бүлэгт 3.42±7.14 pg/ml, тохиолдлын бүлэгт 178.84±262.65 pg/ml байсан бол IFN-γ цитокины хэмжээ хяналтын бүлэгт 6.13±16.5 pg/ml, тохиолдын бүлэгт 182.04±473.06 pg/ml тодорхойлов.
2. Echinococcus spp. –ээр халдварласан шинжлүүлэгчдийн (тохиолдлын бүлэгт) ийлдэс дэх IL-6, IFN-γ цитокины хэмжээг эрүүл хяналтын бүлэгтэй харьцуулахад статистик ач холбогдол бүхий ялгаатай байна.

Ном зүй:

1. *Brunetti, E., Kern, P. & Vuitton, D.A. (2010) Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. ActaTropica 114, 1–16.*
2. *Rigano, R., Profumo, E., Di Felice, G., Ortona, E., Teggi, A. &Siracusano, A. (1995a) In vitro production of cytokines by peripheral blood mononuclear cells from hydatid patients. Clinical Experimental Immunology 99, 433–439*
3. *Mezioug D &Touil-Boukoffa C. Cytokine profile in human hydatidosis: possible role in the immune surveillance of patients infected with Echinococcus granulosus. Parasite 2009; 16: 57–64.*
4. *Emery I, Liance M, Deriaud E, et al. Characterization of T-cell immune responses of Echinococcus multilocularis-infected C57BL / 6J mice. Parasite Immunol 1996; 18: 463–472.*
5. *Bayraktar MR, Mehmet N &Durmaz R. Th1 and Th2 inducing cytokines in cystic echinococcosis. Turkiye Parazitol Derg 2005; 29: 167–170.*
6. *Teggi, A., Lastilla, M.G. & De Rosa, F. (1993) Therapy of human hydatid disease with Mebendazole and Albendazole. Antimicrobial Agents Chemotherapy 37, 1679–1684.*
7. *Dalila Mezioug, ChafiaTouil-Boukoffa. 2012.Human cystic echinococcosis: a possible involvement of IL-17A in immune protection against Echinococcus granulosus infection. Eur. Cytokine Netw.Vol. 23 n◦ 3, July-August-September 2012, 112-9*
8. *Cox FEG, Liew Y. Cell subsets, and cytokines in parasitic infections. Parasitol Today 1992; 8: 371.*
9. *Cetre C, Pierrot C, Cocude C, et al. Profiles of Th1 and Th2 cytokines after primary and secondary infection by Schistosoma mansoni in the semi permissive rat host. Infect Immunol1999; 67: 2713*
10. *Caceres-Dittmar G, Tapia FJ, Sanchez MA, et al. Determination of the cytokines profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. ClinExpImmunol1993; 91: 500.*
11. *Melby PC, Andrade-Narvaez FJ, Darnell BJ, Valencia-Pacheco G, Tryan W, Palomocetina A. Increased expression of proinflammatory cytokines in chronic lesions of human cutaneous leishmaniasis. Infect Immunol1994; 62: 837.*
12. *Cesbron JY, Capron M, Capron A. Le diagnostic immunologique de l'hydatidose humaine. Gastroentérol ClinBiol 1986; 10: 415.*

IL-6 and IFN-γ detection in patients with *Echinococcus* spp. Infection

Amarbayasgalan Z[1], Ulziisaikhan B[2], Agarzandan B[1], Khulan B[3], Mungunzaya T[1], Burnee M[1], Giimaa N[1], Narankhajid M[1], Chimidtseren S[2], Gurbadam A[1], Temuulen D[1]

[1]Department of Biology, School of Biomedicine, MNUMS
[2]Department of Immunology, School of Biomedicine, MNUMS
[3]Department of Histology, School of Biomedicine, MNUMS
E-mail: amarbayasgalan@mnums.edu.mn, Tel: +976-99556520

Background: Echinococcosis is a chronic, unnoticed zoonotic disease caused by tapeworm larvae of the genus Echinococcus. EgA31 and EgTrp antigens, which are responsible for *Echinococcus granulosus* PAMPs, specifically stimulate IL-10 secretion. Echinococcus infection is associated with a 25% change of recurrence, and patients with recurrence have increased cytokines Th1 (IFN-g) and Th2 (IL-4, IL-10) after treatment. Zang (2008) noted that 82% of cystic analysts tested positive for IL-4, 74% for IL-10, and 50% for IFN- γ. The results of the above study suggest that the determination of serum cytokines in the treatment of cystic echinococcoccus is as important as the assessment of disease progression and treatment outcome

Aim: Determine the serum levels of IL-6, IFN-γ cytokines in Echinococcus infected assays and compare them with treatment

Materials and Methods: This study will be performed using an experimental research model. The study will be conducted from November 20, 2019 to February 20, 2020, based on the Laboratory of Clinical Pathology at the Department of Microbiology and Immunology, School of Biomedicine, Mongolian University of Science and Technology

Results: Serum IL-6 was 3.42±7.14 pg/ml and 178.84±262.65 pg/ml in control and case group respectively. IFN-γ level was 6.13±16.5 pg/ml and 182.04±473.06 pg/ml in control and case group respectively. These results were statistically significant (P<0.0001). Serum IFN-γ level is statistically significant for case and control group comparison analysis (P=0.0032).

Conclusion: Serum IFN-γ and IL-6 levels are statistically significant for case and control group comparison analysis.

Keywords: Monoclonal antibody, Metacestode, Standard curve, Hydatid