

Interleukin-8, monocitni kemotaktični protein-1 i interleukin-10 u infekcijama s leptospirama i hantavirusima

Ljiljana ŽMAK¹⁾ dr. sc., dr. med.,
specijalizant mikrobiologije
Alema MARKOTIĆ²⁾, prof. dr. sc.,
dr. med., specijalist infektologije
Ljiljana MIŠIĆ MAJERUS³⁾, prim.
dr. med., specijalist infektologije

¹⁾Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb

²⁾Klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević", Zagreb

³⁾Opća bolnica "Dr. Tomislav Bardek", Koprivnica

Ključne riječi

hemoragijska vrućica s bubrežnim sindromom
leptospiroza
citokini/kemokini
imunološki odgovor

Key words

hemorrhagic fever with renal syndrome
leptospirosis
cytokines/chemokines
immune response

Primljeno: 2011-03-11

Received: 2011-03-11

Prihvaćeno: 2011-03-21

Accepted: 2011-03-21

Uvod

Leptospiroza i hemoragijska vrućica s bubrežnim sindromom (HVBS) su zoonoze rasprostranjene širom svijeta [1, 2, 3]. Kako obje bolesti predstavljaju važan javno-zdravstveni problem, važno je prepoznati i razlikovati obje bolesti kao i pretpostaviti mogućnost dvojnih infekcija [4, 5].

Leptospiroza i HVBS su akutne febrilne bolesti koje načešće pogađaju bubrege, dovodeći u nekim slučajevima i do bubrežne insuficijencije. Nisu rijetkost ni poremećaji funkcije pluća i jetre [4, 5, 6]. Klinička slika leptospiroze bez klinički prepoznate žutice oponaša kliničku sliku HVBS-a i *vice versa* [5, 6].

Znanstveni rad

Leptospiroza i hemoragijska vrućica s bubrežnim sindromom (HVBS) su zoonoze rasprostranjene širom svijeta te je gotovo cijela Hrvatska, osim otoka i priobalja, endemsko područje za obje bolesti. Cilj našeg istraživanja bio je prikazati dolazi li pri akutnoj infekciji leptospirama do izlučivanja interleukina-8 (IL-8), monocitnog kemotaktičnog proteina-1 (MCP-1) i interleukina-10 (IL-10) te postoji li razlika u dinamici njihovog izlučivanja tijekom razvoja bolesti. Ujedno smo planirali prikazati dolazi li do izlučivanja ovih citokina u bolesnika s dokazanim akutnim HVBS-om te postoji li razlika u njihovoj razini u odnosu na bolesnike s leptospirozom. Razine IL-8 i MCP-1 su bile statistički značajno povišene u bolesnika s leptospirozom u odnosu na zdrave kontrole, a razina im se održavala u istim granicama tijekom cijelog trajanja bolesti. Razine IL-8 i MCP-1 su bile povišene i u bolesnika s HVBS-om, međutim nije bilo značajnih razlika u razini testiranih citokina između bolesnika s leptospirozom i HVBS-om.

Interleukine-8, monocyte chemotactic protein-1 and interleukine-10 in leptospiral and hantaviral infections

Scientific paper

Leptospirosis and hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) are zoonoses distributed worldwide and almost entire Croatia except its islands and seaside is endemic region for these diseases. The aim of our study was to analyze the levels of interleukine-8 (IL-8), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) and interleukine-10 (IL-10) in patients with acute leptospirosis and to determine the dynamics of their production during the course of the disease. Moreover, we analyzed the levels of these cytokines in patients with acute HFRS and compared them with the levels found in patients with leptospirosis. In comparison to controls, significantly higher production of IL-8 and MCP-1 was found in patients with acute leptospirosis, but the levels were unchanged during the course of the disease. Significantly higher levels of IL-8 and MCP-1 were also found in patients with acute HFRS, however there was no significant difference in the measured cytokine level between patients with HFRS and leptospirosis.

Leptospiroze su skupina bolesti izazvanih mikroorganizmima roda *Leptospira* [1]. Najčešće serološke skupine ili tipovi u Hrvatskoj su: *L. icterohaemorrhagiae*, *L. javanica* i *L. canicola* [9]. One su tipične zoonoze, a rezervoar uzročnika su različite životinje, od štakora i miševa do domaćih životinja (npr. pas i govedo) [9, 10]. Uzročnike bolesti u životinjama nalazimo u urinu, tkivu posteljice i amnionskoj tekućini, a ljudi se najčešće zaraze u kontaktu sa zaraženim tлом i vodom [10]. Ulazna vrata u organizam su malene ozljede epidermisa, spojnice oka, sluznice usta, ždrijela, tonzila, ali je moguća i zaraza inhalacijom zaraženog aerosola [1, 4, 10, 11]. Težina infekcije varira od subkliničkih zaraza, prepoznatljivih jedino serološkim testovima, do teških, potencijalno fatalnih

bolesti, karakteriziranih kombinacijom insuficijencije bubrega, jetre i hemoragijskom dijatezom (tzv. Weilova bolest) [11]. Inkubacija traje većinom jedan do dva tjedna. Bolest obično počinje naglo, s groznicom, tresavicom, visokom temperaturom, prostracijom, bolovima u listovima, a često se javlja mučnina i simptomi od strane centralnog živčanog sustava (meningizam, encefalitički simptomi i dr.). Temperatura ostaje povišena tri do pet dana i tada se spušta na normalu. U većine ljudi to je kraj bolesti, međutim kod drugih javlja se ponovno povišenje temperature praćeno afekcijom organa (jetra, bubrezi, meninge) [1, 4, 9, 10, 11, 12]. Dijagnoza se postavlja testovima mikroaglutinacije i enzimskim imunotestom (ELISA). Blaži oblici bolesti obično ne trebaju specifično liječenje, dok se u težih oblika primjenjuju penicilin i doksiciklin [1, 11, 12]. Diferencijalno-dijagnostički u obzir dolaze mnoge bolesti: influenza, akutne infekcije mokraćnog sustava, bakterijska sepsa, akutni glomerulonefritisi, ali i hantavirusna infekcija [1, 4, 9, 10, 11, 12].

Hantavirusi pripadaju porodici *Bunyaviridae*, a poznato je više od 20 vrsta. Hrvatska je endemsko područje za hantaviruse, a prema dosadašnjim istraživanjima manifestne infekcije u ljudi su izazvane virusima Puumala i Dobrava [6]. Rezervoari ovih uzročnika u prirodi su mali glodavci (riđa voluharica, poljski miševi, štakori i dr.) koji virus izlučuju putem urina, fecesa i sline. Udisanje zaraženog aerosola dokazan je način zaraze u ljudi [2, 13]. Za laboratorijsku dijagnozu akutne infekcije koriste se serološke metode i lančana reakcija polimerazom (PCR). Klinička slika varira od lagane febrilne bolesti do teških slučajeva s renalnom insuficijencijom i smrću. Najčešći klinički znaci su povišena tjelesna temperatura, opći algički sindrom, mučnina, različite hemoragijske manifestacije, zamućen vid i bubrežni simptomi [6, 8, 15]. Liječenje je u osnovi simptomatsko, međutim novija istraživanja pokazuju da intravensko davanje antivirusika ribavirina do sedmog dana od početka bolesti smanjuje težinu bolesti i stopu smrtnosti [16].

Još uvijek se malo zna o imunopatogenezi obiju bolesti. Važnu ulogu u tijeku i razvoju nekih poremećaja u zaraznim bolestima imaju kemokini i njihovi receptori [17–21].

Kemokini čine obitelj kemotaktičnih citokina koji imaju važnu ulogu kako u imunoreakcijama tijekom infektivnih bolesti i tumorskom rastu, tako i u fiziološkim funkcijama organizma (hematopoeza, angiogeneza i diferencijacija stanica) [20, 22]. Kemokine izlučuju i mnoge stanice uključujući i leukocite, epitelne stanice, endotelne stanice, fibroblaste i dr. Proizvode se kao odgovor na egzogene stimuluse (virusi, bakterije), ali i endogene stimuluse (interleukin-1, faktor nekroze tumora- α , interferon- γ) [17–22]. Ključna uloga kemokina je u usmjeravanju i aktivaciji leukocita. Kemokini ostvaruju svoje učinke preko kemokinskih receptora koji su građeni od sedam transmembranskih domena. Oslanjajući se na klasifikaciju za

kemokine i njihovi receptori se dijele u četiri skupine: CXCR, CCR, CR i CX₃CR. Među njima neki vežu samo određene ligande, dok drugi vežu više njih [22].

IL-8 pripada prvoj skupini kemokina, CXC, u kojoj su dva cisteinska ostatka razdvojena jednom aminokiselinom. Prema novoj nomenklaturi označava se kao CXCL8 [22]. Biološka aktivnost IL-8 ostvaruje se vezivanjem na receptore CXCR1 i CXCR2. Geni za ove receptore pronađeni su u neutrofilima, monocitima, trombocitima i drugim stanicama. Dokazano je da neutrofili pokazuju najveći broj receptora u približno jednakom omjeru [22, 23]. Vjeruje se da CXCR1 poglavito djeluje na samom mjestu upale, dok bi CXCR2 bio zaslužan za početak neutrofilne migracije iz udaljenih područja. Lučenje IL-8 je stimulirano mnogim čimbenicima, kao što su proupalni citokini, bakterijski produkti, virusi i mnogi drugi. IL-8 djeluje i na aktivnost limfocita, bazofila, eozinofila, fibroblasta, endotelnih stanica, keratinocita, glatkih mišićnih stanica i dr. [22, 23].

MCP-1 je protein građen od 76 aminokiselina i spada u CC-grupu kemokina, u kojoj cisteinski ostaci leže jedan do drugog. Prema novoj nomenklaturi označava se kao CCL2. Svoju biološku aktivnost ostvaruje vezivanjem za svoje receptore CCR2A i CCR2B. Njegova važna funkcija u organizmu je da regrutira prvenstveno monocite, te se stoga najviše proizvodi u kroničnim oboljenjima [22, 23].

IL-10 je acidolabilni citokin kojeg izlučuju monociti, CD4+ limfociti T, NK-stanice i limfociti B. Ima značajnu ulogu u regulaciji imunoreakcija. IL-10 svojim djelovanjem značajno modulira ekspresiju citokina, solubilnih medijatora i površinskih molekula stanica mijeloidnog porijekla. Jedna od njegovih najvažnijih uloga je deaktivacijski učinak na monocite-makrofage, granulocite i dendritičke stanice [24–27]. Također su otkriveni virusni homolozi IL-10 [28].

Cilj našeg istraživanja je bio odrediti razine IL-8, MCP-1 i IL-10 u serumima bolesnika u akutnoj infekciji leptospirama ili hantavirusima. Drugi cilj je bio odrediti potencijalnu razliku u razinama mjerenih parametara među bolesnicima inficiranim leptospirama ili hantavirusima, što bi dodatno moglo koristiti pri diferencijalnoj dijagnostici dvije bolesti.

Bolesnici i metode ispitivanja

Bolesnici

Serume 16 bolesnika u kojih je dokazana infekcija leptospirama i 16 bolesnika u kojih je dokazana infekcija hantavirusima testirali smo na IL-8, MCP-1 i IL-10. Istovremeno smo testirali serume 16 zdravih kontrola. U većine bolesnika s leptospirozom, za testiranje su bila dostupna tri konsektivna seruma uzeta tijekom hospitalizacije i rekonvalescencije (Tablica 1).

Tablica 1. Serumi bolesnika s dokazanom leptospirozom testirani na IL-8, MCP-1 i IL-10

Table 1. Sera of patients with leptospirosis tested for IL-8, MCP-1 and IL-10 production

Serum	Broj seruma	Dan bolesti
I	16	3–7
II	16	8–15
III	10	16–30

Metode ispitivanja

Određivanje specifičnih antitijela IgM i IgG na leptospire ELISA testom

Specifična IgM i IgG antitijela na leptospire odredili smo koristeći ELISA kitove (Leptospira Microwell Serum ELISA, Lepto-M i Lepto-G Specific, IVD Research Inc., Carlsbad, CA, SAD), prema uputama proizvođača.

Određivanje specifičnih antitijela IgM i IgG na hantaviruse ELISA testom

Serume bolesnika smo testirali ELISA IgM (capture) testom s antigenima Hantaan 76-118 (HTN) i Puumala CG 18-20 (PUU) i ELISA IgG-testom, s antigenima Hantaan 76-118 (HTN), Puumala CG 18-20 (PUU) i Dobrava 907/5 (DOB) (Regionalni centar Svjetske zdravstvene organizacije za HVBS, Ljubljana, Slovenija), kako je ranije opisano [29].

Određivanje IL-8, MCP-1 i IL-10 ELISA testom

IL-8, IL-10 i MCP-1 testirali smo koristeći ELISA testove (OptEIA™ Set: Human IL-8, OptEIA™ Set: Human Interleukin-10, OptEIA™ Set.: Human MCP-1, Pharmingen, San Diego, CA, SAD), prema uputama proizvođača.

Statistička analiza

U analizi rezultata smo koristili deskriptivnu statistiku, te neparametrijske testove *Friedman ANOVA & Kendall's concordance* i *Mann-Whitney U test* uz *Holmovu* korekciju [30].

Usporedba tri testirane skupine u analizi promjena u razini kemokina i citokina u tri konsektivna seruma bolesnika s leptospirozom izvršena je korištenjem *Friedman ANOVA & Kendall's concordance* testa. Usporedba svih mjerenih parametara u bolesnika prema zdravim kontrolama izvršena je *Mann-Whitney U* testom [31].

Rezultati

Leptospiroza

Slika 1.a) pokazuje postojanje statistički značajne razlike u razini IL-8 u bolesnika s leptospirozom ($n = 16$) u

odnosu na zdrave ispitanike ($n = 16$) cijelim tijekom bolesti. Međutim, nismo našli statistički značajnu razliku u razini IL-8 među konsektivnim serumima 16 bolesnika s leptospirozom testiranim u prvom (I serum), i drugom (II serum) tjednu bolesti, te između trećeg i četvrtog tjedna bolesti, odnosno tijekom rekonvalescencije (III serum). Sličan nalaz smo zabilježili i u razini MCP-1 u bolesnika s leptospirozom (Slika 1.b). Iako nema signifikantne razlike u njegovoj razini među konsektivnim serumima, uočili smo blagi rast mediana od prvog do trećeg seruma. U 38 % bolesnika s leptospirozom, u početnoj, akutnoj fazi bolesti izmjerili smo povišene razine IL-10 (I serum). U ostalim serumima, razina IL-10 se dva tjedna kasnije spustila na razinu zdravih kontrola (Slika 1.c).

Hemoragijska vrućica s bubrežnim sindromom

Slika 2 pokazuje da je u bolesnika s HVBS-om došlo do povišenja razine IL-8, MCP-1 i IL-10 u početnoj, akutnoj fazi bolesti. Statistički značajnu razliku zabilježili smo u razini IL-8 i MCP-1 u bolesnika s akutnim HVBS-om ($n = 16$) u odnosu na zdrave ispitanike ($n = 16$). Slično bolesnicima inficiranim leptospirozom, 31 % bolesnika s HVBS-om imali su povišenu razinu IL-10 u odnosu na zdrave kontrole, no razlika nije bila statistički značajna.

Leptospiroza i HVBS

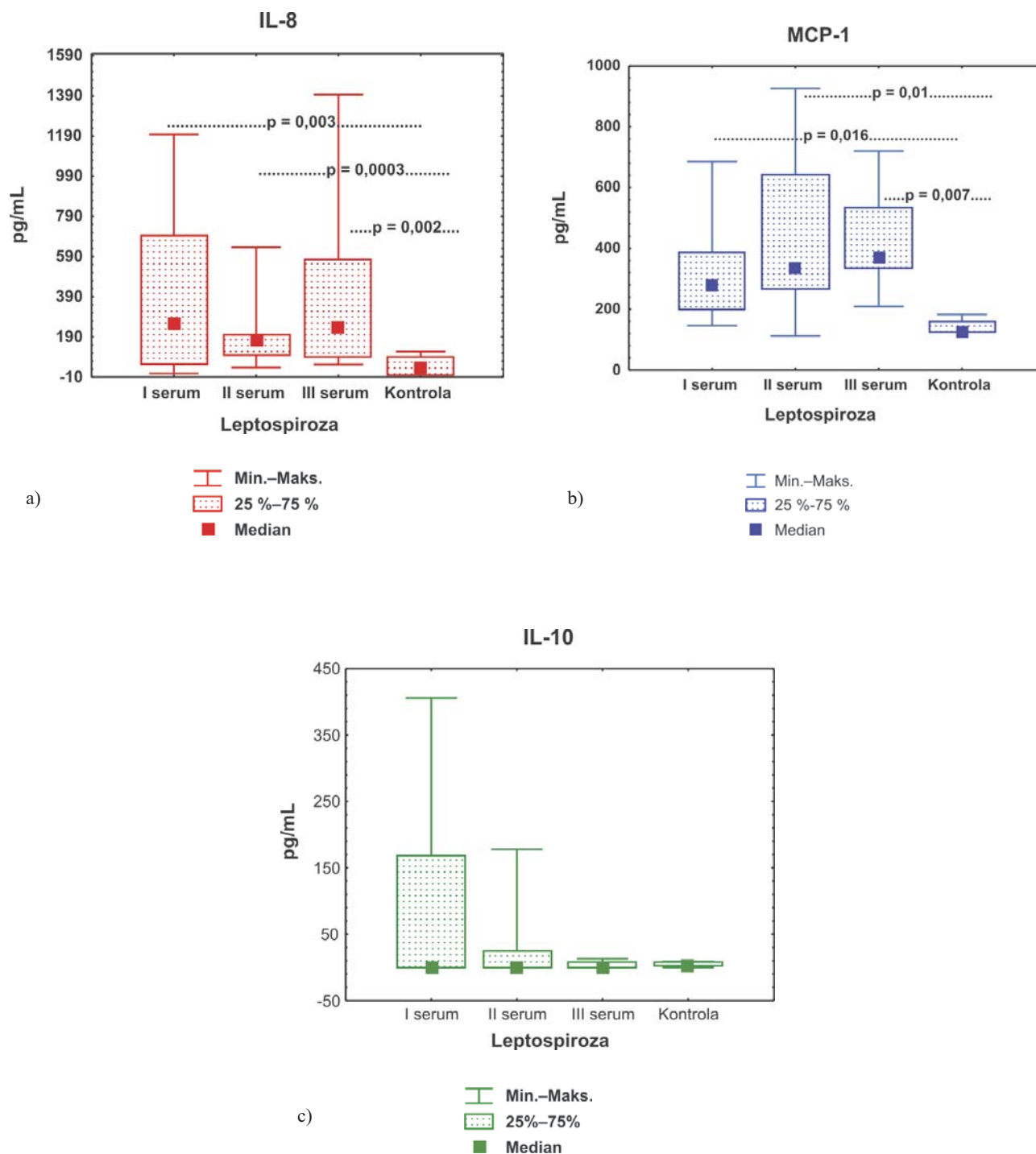
Nismo našli statistički značajnu razliku u razinama IL-8, MCP-1 i IL-10 u bolesnika s leptospirozom ($n = 16$) i HVBS-om ($n = 16$) pri testiranju seruma u početnoj, akutnoj fazi bolesti (I serum). Median za razinu IL-8 bio je isti u bolesnika obje skupine, iako su nešto više vrijednosti zabilježene u bolesnika s HVBS-om. Također smo zamijetili nešto višu razinu MCP-1 u bolesnika s HVBS-om, dok je razina IL-10 bila nešto viša u bolesnika s leptospirozom, no razlika nije bila statistički značajna (Slika 3).

Dvojna infekcija virusom Dobrava i leptospirom

Slika 4. prikazuje razinu IL-8, MCP-1 i IL-10 u tri konsektivna seruma u jednog bolesnika u kojeg je dokazana dvojna infekcija leptospirom i virusom Dobrava. Vrijednosti su u sva tri seruma bile više od maksimalnih vrijednosti za zdrave kontrole. Također su sve izmjerene vrijednosti bile više od mediana vrijednosti u bolesnika oboljelih samo od leptospiroze ili samo od HVBS-a.

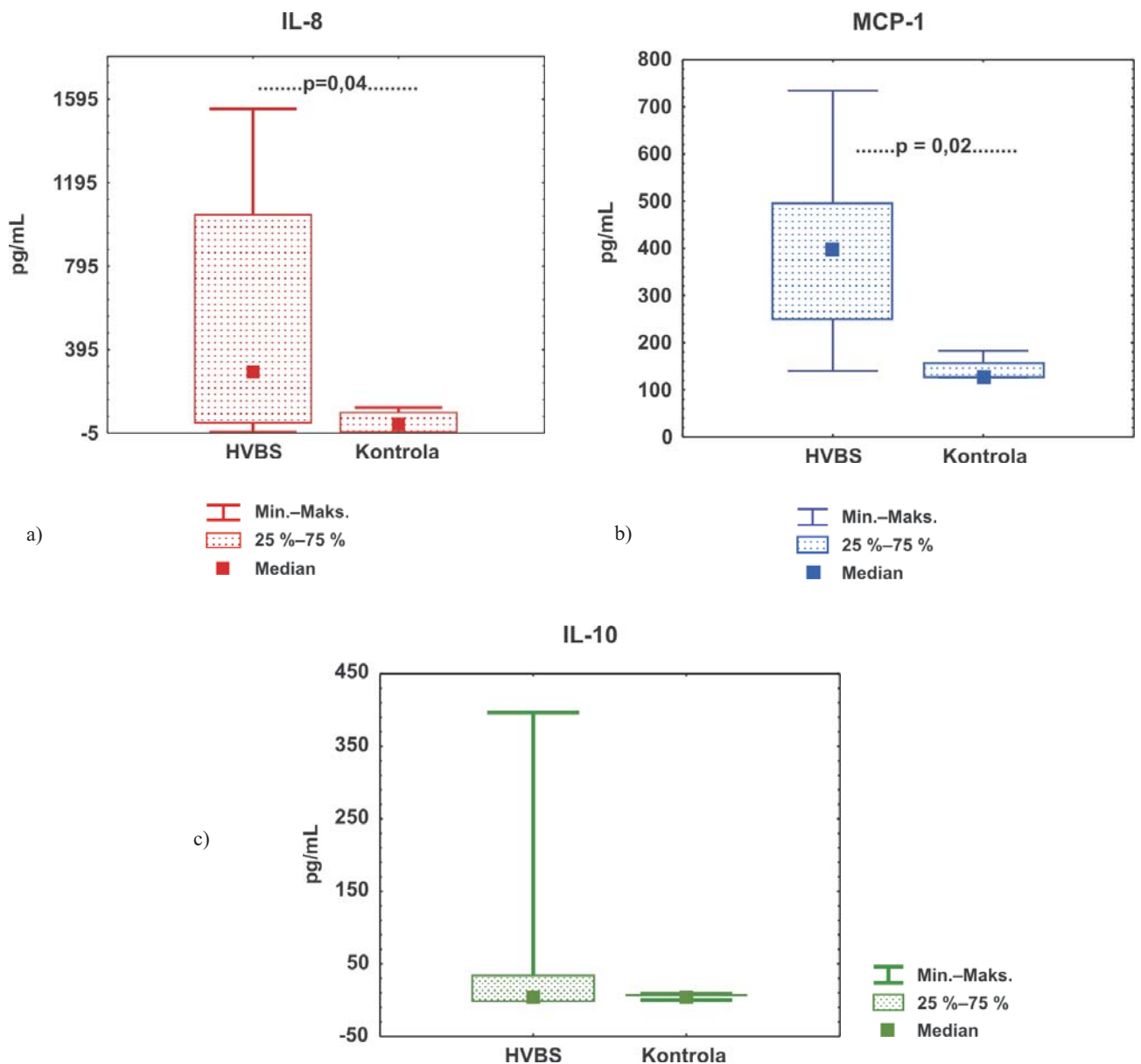
Rasprava

Leptospiroza kao re-emergentna, i HVBS kao emergentna zoonoza su raširene po cijelom svijetu i predstavljaju značajan globalni javnozdravstveni problem [1–3]. Zbog toga je važno dijagnostički prepoznati i razlikovati ove dvije bolesti te također misliti na mogućnost pojave



Slika 1. Razina (a) interleukina-8 (IL-8), (b) monocitnog kemotaktičnog proteina (MCP-1) i (c) interleukina-10 (IL-10) u I (n = 16), II (n = 16) i III (n = 10) uzorku seruma bolesnika s leptospirozom. Ne postoji statistički značajna razlika u razini (a) IL-8, (b) MCP-1 i (c) IL-10 među konsekvativnim serumima obojelih od leptospiroze (*Friedman ANOVA & Kendall's concordance test*; razlika je značajna kod $p < 0,05$). Statistički značajna razlika postoji između razine (a) IL-8 i (b) MCP-1 u I, II i III serumu obojelih u odnosu na zdrave kontrole (n = 16) (*Mann-Whitney U test*; razlika je značajna kod $p < 0,05$).

Figure 1. Levels of (a) interleukine-8 (IL-8), (b) monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) and (c) interleukine-10 (IL-10) in I (n = 16), II (n = 16) and III (n = 10) sera of patients with leptospirosis. There was no statistically significant difference in the level of (a) IL-8, (b) MCP-1 and (c) IL-10 between consecutive sera from patients with leptospirosis (*Friedman ANOVA & Kendall's concordance test*, the difference was significant at $p < 0.05$). A statistically significant difference exists between the level of (a) IL-8 and (b) MCP-1 in I, II and III patients' serum compared to healthy controls (n = 16) (*Mann-Whitney U test*, the difference was significant at $p < 0.05$).



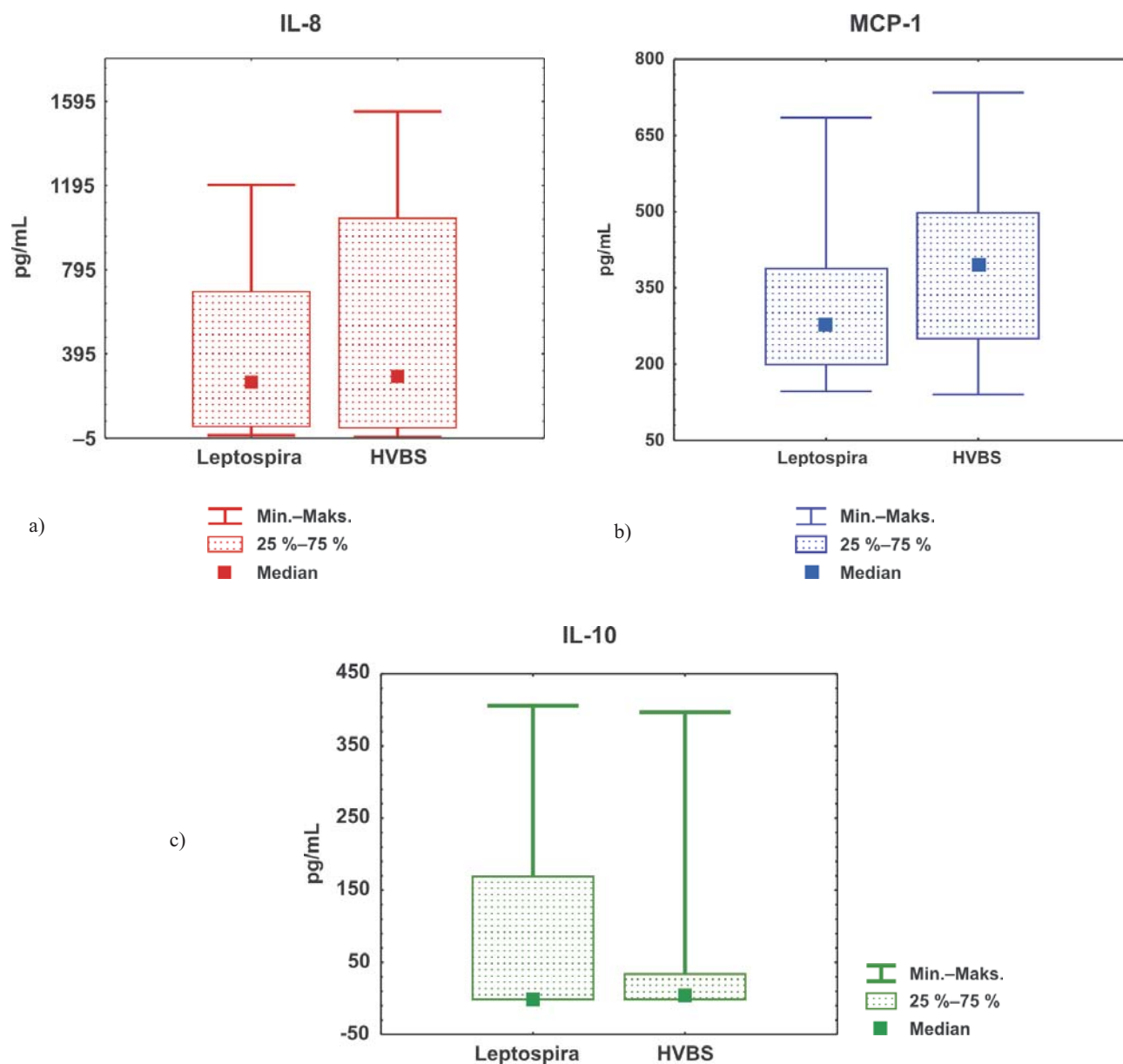
Slika 2. Razina (a) interleukina-8 (IL-8), (b) monocitnog kemotaktičnog proteina (MCP-1) i (c) interleukina-10 (IL-10) u serumima ($n = 16$) bolesnika s akutnom hemoragijskom vrućicom s bubrežnim sindromom (HVBS). Statistički značajna razlika postoji između razine (a) IL-8 i (b) MCP-1 u serumu oboljelih u odnosu na zdrave kontrole ($n = 16$) (*Mann-Whitney U test*; razlika je značajna kod $p < 0,05$).

Figure 2. Levels of (a) interleukine-8 (IL-8), (b) monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) and (c) interleukine-10 (IL-10) in sera ($n = 16$) of patients with acute hemorrhagic fever with renal syndrome. A statistically significant difference exists between the level of (a) IL-8 and (b) MCP-1 in serum of patients than in healthy controls ($n = 16$) (*Mann-Whitney U test*, the difference was significant at $p < 0.05$).

dvojnih infekcija [4, 5]. Naša pozornost u ovom radu je najvećim dijelom bila usmjerena na neke imunološke parametre kod leptospiroze te moguće sličnosti ili razlike s HVBS-om.

Još uvijek mali broj objavljenih radova u dostupnim bazama za pretraživanje obrađuje problem imunopatogeneze leptospiroza [32–36]. Dokazana je povišena razina

TNF- α u serumima bolesnika s leptospirozom, a *in vitro* istraživanje je pokazalo da bi za indukciju TNF- α iz humanih monocita mogao biti odgovoran peptidoglikan leptospire [31]. U dva dosadašnja *in vitro* ispitivanja s vanjskim proteinom ovojnice patogenih leptospira dodanih u kulturu bubrežnih tubularnih stanica dokazano je da dolazi do povišene ekspresije MCP-1 i TNF- α [33, 34]. Također



Slika 3. Razina (a) interleukina-8 (IL-8), (b) monocitnog kemotaktičnog proteina (MCP-1) i (c) interleukina-10 (IL-10) u serumima bolesnika s akutnom leptospirozom ($n = 16$) i hemoragijskom vrućicom s bubrežnim sindromom (HVBS) ($n = 16$). Ne postoji statistički značajna razlika u razini (a) IL-8, (b) MCP-1 i (c) IL-10 u serumu bolesnika s akutnom leptospirozom u odnosu na bolesnike s HVBS-om (*Mann-Whitney U test*; razlika je značajna kod $p < 0,05$).

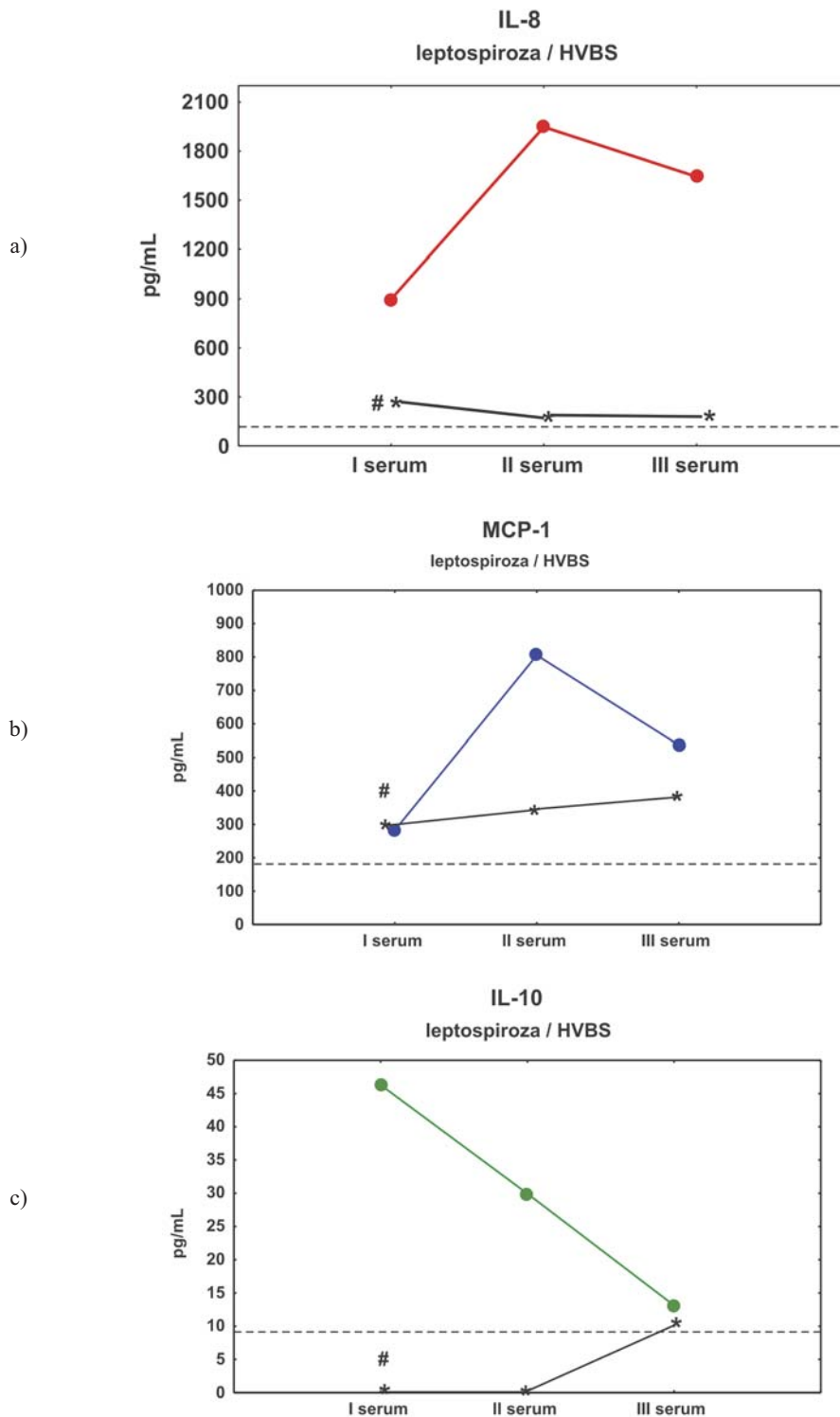
Figure 3. Comparison of levels of (a) interleukine-8 (IL-8), (b) monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) and (c) interleukine-10 (IL-10) in sera of patients with acute leptospirosis ($n = 16$) and hemorrhagic fever with renal syndrome ($n = 16$). There was no statistically significant difference in the level of (a) IL-8, (b) MCP-1 and (c) IL-10 in patients with acute leptospirosis than in patients with HFRS (*Mann-Whitney U test*, the difference was significant at $p < 0.05$).

je dokazano da glikoprotein patogenih i nepatogenih leptospira može inducirati produkciju IL-10 kad se njime induciraju periferni mononukleari zdravih davaoca [35].

Nekoliko studija ukazuje da proupalni citokini IL-1, IL-6 i TNF- α imaju ulogu u patogenezi HVBS-a [36–39]. Međutim, za sada ne postoje istraživanja o ulozi kemokina u ovih bolesnika. Naša *in vitro* ispitivanja su pokazala da

bi i CC- (MCP-1, MIP-1 α /CCL3, MIP-1 β /CCL4 i RANTES/CCL5) i CXC- kemokini (IL-8), te njihovi receptori mogli imati ulogu u imunopatogenezi HVBS-a [40, 41].

Svojim istraživanjem smo po prvi puta pokazali da tijekom leptospiroze postoji značajno povišenje IL-8 i MCP-1 u cirkulaciji bolesnika u odnosu na zdrave ispi-



Slika 4. Razina (a) interleukina-8 (IL-8), (b) monocitnog kemotaktičnog proteina (MCP-1) i (c) interleukina 10 (IL-10) u I, II i III uzorku seruma bolesnika s dvojnjom infekcijom leptospirom i virusom Dobrava. Razina (a) IL-8 je u sva tri seruma viša od mediana (-*) razine u I, II i III serumu 16 bolesnika od leptospiroze, kao i akutnom serumu 16 bolesnika od hemoragijske vručice s bubrežnim sindromom (HVBS) (#). Isti nalaz zapažamo u razini (b) MCP-1 u II i III serumu, kao i razini (c) IL-10 u sva tri seruma.

Figure 4. Levels of (a) interleukine-8 (IL-8), (b) monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and (c) interleukine-10 (IL-10) in I, II and III sera of patients with double infection with leptospira and Dobrava virus. The inferior line represents the highest measured levels of tested cytokines in healthy controls. Level (a) of IL-8 in all three serum is higher than the median serum levels in (-*) I, II and III serum of 16 patients with leptospirosis and acute serum of 16 patients with haemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) (#). The same result observed in the level of (b) MCP-1 in II and III levels, as well as the level (c) IL-10 in all three sera.

tanike. Povišene vrijednosti ovih parametara su nađene i u akutnoj fazi HVBS-a, što također do sada nije opisano u dostupnoj literaturi. Također smo zapazili da se te vrijednosti gotovo kontinuirano održavaju od početka bolesti, kao i u fazi rekonvalescencije. Iako vrijednosti nisu bile statistički značajne u odnosu na kontrolne, razina IL-10 je u obje bolesti bila povišena u oko trećine bolesnika na početku bolesti. Zanimljivo je da se vrijednosti ispitivanih kemokina nisu statistički razlikovale u bolesnika s leptospirozom i HVBS-om, iako su zapažene nešto više vrijednosti IL-8 i MCP-1 u bolesnika s HVBS-om. Prema našem znanju ovo je prva usporedba imunoloških parametara u ove dvije, po kliničkom tijeku, vrlo slične bolesti.

Za stvarnu spoznaju o ulozi kemokina u leptospirozi i HVBS-u potrebna su dodatna *in vitro*, te klinička istraživanja. Također je neophodno analizirati kliničku sliku i laboratorijske nalaze u oboljelih od leptospiroze da bismo pokazali postoje li korelacije između naših parametara i općih kliničkih i biokemijskih parametara.

I MCP-1 i IL-8 imaju ulogu u imunopatogenezi akutnih i kroničnih bubrežnih bolesti [42, 45]. Pokazano je da IL-8 sudjeluje u oštećenju bubrežne funkcije eksperimentalnog glomerulonefritisa izazvanog imunokompleksima uz kemotaksiju i aktivaciju neutrofila [40]. Dosadašnje studije pokazuju da MCP-1 igra dominantnu ulogu u inicijaciji i progresiji različitih oblika nefritisa, kako glomerularnog, tako i tubulointersticijskog. U jednoj od studija je pokazano da tubularne epitelne stanice predstavljaju primarni izvor MCP-1. Također je pokazano da angiotenzin II preko receptora AT_{1a} posreduje kasnu ekspresiju MCP-1 i može igrati ulogu u progresiji imunološki posredovanog bubrežnog oštećenja [40, 43]. Biopsija bubrega u bolesnika s akutnim intersticijskim nefritismom je pokazala ekspresiju tog kemokina u tubularnim kao i infiltrirajućim stanicama, te parijetalnim stanicama Bowman-ove kapsule [43]. IL-8 također može imati ulogu u imunopatogenezi plućnih bolesti, a visoke vrijednosti su nađene u bolesnika s pleuralnim efuzijama [20, 22]. Također su visoke vrijednosti oba kemokina nađene u serumu bolesnika s teškim oblicima denga vrućice [44]. O tome kakva je moguća uloga ovih kemokina u imunopatogenetskim poremećajima bubrega i pluća u leptospirozi i HVBS-u još se ne zna. IL-8 izlučuju brojne stanice čovječjeg organizma i vjerojatno ima važnu ulogu i u prvoj liniji obrane nespecifičnoj imunosti [22]. Općenito, IL-8 ima ulogu u kemotaksiji i aktivaciji neutrofila, pri čemu inducira promjene njihovog oblika, polimerizaciju aktina, te njihovu degranulaciju. On pojačava odstranjivanje mikroorganizama povišenjem baktericidne aktivnosti neutrofila i stimulira fagocitozu opsoniziranih čestica. Također pod njegovim djelovanjem dolazi do indukcije atehzijskih molekula (L-selektina i β_2 -integrina) na neutrofilima. Svoj učinak ima i na limfocite, bazofile i eozinofile. Iako nema kemotaksijskog učinka na monocite utječe na

povišnje ekspresije integrina na monocitima i njihovu atherenciju na endotelne stanice [20, 22, 23]. Poznato je da monociti igraju važnu ulogu u inicijalnoj fazi HVBS-a [38]. Ono što bi također moglo biti značajno u imunopatogenezi i leptospiroze i HVBS-a je da IL-8 uzrokuje vaskularnu permeabilnost preko prolazne regrutacije i lokalne aktivacije neutrofila, a vaskularna permeabilnost je jedna od značajki patofizioloških poremećaja u obje bolesti [17, 22]. Porijeklo IL-8 u ovim bolestima ne mora biti primarno od neutrofila. Možemo pretpostaviti da bi u leptospirozi i HVBS-u, endotelne stanice također mogle biti bogat i jedan od važnijih izvora tog kemokina.

Ekspresiju gena i produkciju MCP-1 u brojnim stanicama u organizmu mogu inducirati i neki proupalni citokini kao što su: IL-1 β , IFN- γ i TNF- α , za koje je dijelom poznato da imaju ulogu u imunopatogenezi leptospiroza ili HVBS-a [36–38]. Glavne stanice koje luče MCP-1 su: fibroblasti, monociti-makrofagi, endotelne stanice, te različite epitelne stanice [20, 22]. Pored uloge u imunopatogenezi bubrežnih bolesti njegova uloga je pokazana i u brojnim drugim bolestima kao što su hepatitis, tumorske bolesti, idiopatska plućna fibroza itd. [20, 39, 43]. Za razliku od IL-8, koji ima predominantno kemotaksijsko djelovanje na neutrofile, MCP-1 vrši kemotaksiju monocita-makrofaga, a također i limfocita T, bazofila, eozinofila, mastocita i NK-stanica [17, 20, 22, 23]. Svojim kemotaksijskim djelovanjem na monocite-makrofage, može imati ulogu ne samo u nespecifičnoj imunosti u početnoj fazi HVBS-a, nego moguće i u distribuciji virusa u organizmu, jer su monociti-makrofagi prema dosadašnjim spoznajama prve ciljane stanice za hantaviruse. Također povisuje i ekspresiju β_2 -integrina na monocitima-makrofagima [20, 22].

Pored uloge proupalnih kemokina, IL-8 i MCP-1, željeli smo utvrditi postoji li povišena razina i kakva bi bila dinamika IL-10, u leptospirozi i HVBS-u, zbog njegovog mogućeg protuupalnog i imunosupresivnog djelovanja [24, 25]. Kao što smo već istaknuli, u jedne trećine bolesnika s leptospirozom ili HVBS-om nalazimo povišene vrijednosti ovog citokina, ali uglavnom na samom početku bolesti. Kao što je već opisano u studiji Diamenta i suradnika, monociti bi mogli biti izvor IL-10 u leptospirozi [35]. Ne treba dakako zanemariti ni CD4+ limfocite T, te NK-stanice kao moguće izvore ovog citokina, kako u leptospirozi, tako i u HVBS-a [26, 27]. Važna uloga ovog citokina je u kontroli sistemskog upalnog procesa [24, 25]. Inhibitorno djelovanje IL-10 na endotoksinima-induciranu proizvodnju proupalnih citokina i kemokina, uključuje i indirektno učinke na aktivaciju endotelne stanice i atehziju [24, 25, 45]. Također može djelovati na ekspresiju monocitnog tkivnog faktora koji sudjeluje u prokoagulantnim aktivnostima i diseminiranoj intravaskularnoj koagulaciji krvi [24, 25]. Svi ti poremećaji doprinose imunopatogenezi leptospiroze i HVBS-a, osobito u teških kliničkih slučajeva. IL-10 svojim djelovanjem

značajno modulira ekspresiju citokina, solubilnih medijatora i površinskih molekula stanica mijeloidnog porijekla, što ima značajne posljedice na funkciju tih stanica, te aktivaciju i održavanje imunoreakcija [25, 26]. IL-10 djeluje slično na monocite i makrofage. On inhibira ekspresiju glavnog kompleksa histokompatibilnosti (MHC) II na njima, te ekspresiju CD54 (intracelularna atezijska molekula-1, ICAM-1), te kostimulacijskih molekula, CD80 (B7.1) i CD86 (B7.2) što snižava mogućnost prepoznavanja monocita-makrofaga kao antigen-prezentirajućih stanica od strane limfocita-T. IL-10 međutim povisuje ekspresiju FcR na monocitima, uključujući CD16 (posreduje fagocitozu i o antitijelima ovisnu stanicama posredovanu citotoksičnost) i CD64 (posreduje fagocitozu), ali snižava s IL-4 induciranu ekspresiju CD23 molekula [25–28]. O tomu postoji li mogućnost da leptospira ili hantavirusi u početku bolesti na neki način pokreću mehanizme za indukciju IL-10 u monocitima-makrofagima, da bi se obranili od njihove aktivacije i posljedičnog izlučivanja proupalnih citokina i kemokina ne postoje nikakvi podaci.

Zanimljiv nalaz smo zabilježili i u bolesnika s dvojnog infekcijom leptospirom i virusom Dobrava. Vrijednosti svih mjerenih parametara su bile daleko više od mediana vrijednosti bolesnika oboljelih samo od leptospiroze ili HVBS-a i kretale su se iznad ili oko maksimalnih vrijednosti za bolesnike s pojedinačnom bolešću. Do sada jedina objavljena imunološka analiza bolesnika s dvojnog infekcijom leptospirom i također virusom Dobrava je naša studija u kojoj je nađeno da su vrijednosti TNF- α i solubilnog (s)CD23 bile značajno više od vrijednosti zabilježenih u bolesnika inficiranih samo hantavirusima [5].

Zaključak

Na osnovi naših rezultata možemo zaključiti da IL-8, MCP-1 i IL-10 imaju značajnu ulogu u imunopatogenezi akutne faze leptospiroze i HVBS-a. Kako ne postoji značajna razlika u razini produkcije ovih parametara, njihovo mjerenje se ne može koristiti u diferencijalno-dijagnostičke svrhe. Brojne su još nepoznanice u imunopatogenezi leptospiroze i hemoragijske vrućice s bubrežnim sindromom, a njihovo rasvjetljavanje će približiti istraživače mogućem uspješnom pronalaznju odgovarajućih cjepiva, antibakterijskoj i antivirusnoj terapiji, učinkovitoj simptomatskoj terapiji, te pružiti pomoć u prognostici ovih bolesti.

Literatura

- [1] Ko AI, Galvão Reis M, Ribeiro Dourado CM, Johnson WD Jr, Riley LW. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. *Lancet* 1999; 354: 820–5.
- [2] Schmaljohn C, Hjelle B. Hantaviruses. A global disease problem. *Emerg Infect Dis* 1997; 3: 95–104.
- [3] Markotić A, LeDuc JW, Hlaca D, Rabatić S, Sarčević A, Dasić G, i sur. Hantaviruses are a likely threat to NATO forces in Bosnia and Herzegovina and Croatia. *Nature Med* 1996; 2: 269–70.
- [4] Clement J, Neild G, Hinrichsen SL, Crescente JA, van Ranst M. Urban leptospirosis versus urban hantavirus infection in Brazil. *Lancet* 1999; 354: 2003–4.
- [5] Markotić A, Kuzman I, Babić K, Gagro A, Nichol S, Ksiazek TG, i sur. Double trouble. Hemorrhagic fever with renal syndrome and leptospirosis. *Scand J Infect Dis* 2002; 34: 221–4.
- [6] Markotić A, Nichol ST, Kuzman I, Sanchez AJ, Ksiazek TG, Gagro A, i sur. Characteristics of Puumala and Dobrava infections in Croatia. *J Med Virol* 2002; 66: 542–51.
- [7] Borčić B, Puntarić D, Turković B, Aleraj B, Tvrtković N. New natural focus of hemorrhagic fever with renal syndrome in Novska. *Croat Med J* 1996; 37: 115–8.
- [8] Kuzman I, Markotić A, Turčinov D, Beus I. Outbreak of hemorrhagic fever with renal syndrome in Croatia in 1995. *Liječ Vjesn* 1997; 119:3 11–5.
- [9] Golubić D, Vurušić B, Krčmar N, Markotić A. Acute renal failure in leptospiral infection in north-western Croatia. *Neurol Croat* 1997; 46: 83–6.
- [10] Douglin CP, Jordan C, Rock R, Hurley A, Levett PN. Risk factors for severe leptospirosis in the parish of St. Andrew, Barbados. *Emerg Infect Dis* 1997; 3: 78–80.
- [11] Leblebicioglu H, Sencan I, Sünbül M, Altıntop L, Günayadin M. Weil's Diseases. Report of 12 cases. *Scand J Infect Dis* 1996; 28: 637–9.
- [12] Nicodemo AC, Duarte MI, Alves VA, Takakura CF, Santos RT, Nicodemo EL. Lung lesions in human leptospirosis: microscopic, immunohistochemical and ultrastructural features related to thrombocytopenia. *Am J Med Trop Hyg* 1997; 56: 181–7.
- [13] LeDuc JW. Epidemiology of hemorrhagic fever viruses. *Rev Infect Dis* 1989; 11 (Suppl.4): 730–5.
- [14] Rossi C, Ksiazek T. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). U: Lee HW, Dalrymple JM. *Manual of hemorrhagic fever with renal syndrome*. 1. izd. Seoul: WHO Collaborating Center for virus Reference and Research (Hemorrhagic fever with renal syndrome) Institute for Viral Diseases, Korea University; 1989, str. 75–106.
- [15] Alexeyev OA, Morozov VG. Neurological manifestations of hemorrhagic fever with renal syndrome caused by Puumala virus. Review of 811 cases. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 255–8.
- [16] Huggins JW, Hsiang CM, Cosgriff TM, Guang MY, Smith JI, Wu ZO, i sur. Prospective, double-blind, concurrent, placebo-controlled clinical trial of intravenous therapy of hemorrhagic fever with renal syndrome. *J Infect Dis* 1991; 164: 1119–27.
- [17] Fresno M, Kopf M, Rivas L. Cytokines and infectious diseases. *Immunol Today* 1997; 18:56–8.
- [18] Nelson PJ, Krensky AM. Chemokines, lymphocytes and viruses. What goes around comes around. *Curr Opin Immunol* 1998; 10: 265–70.
- [19] Murphy PM. Viral exploitation and subversion of the immune system through chemokine mimicry. *Nat Immunol* 2001; 2: 116–22.
- [20] Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nat Immunol* 2001; 2: 108–15.
- [21] Dower SK. Cytokines, virokinins and the evolution of immunity. *Nat Immunol* 2000; 1: 367–8.
- [22] Proudfoot AE. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nature Rev Immunol* 2002; 2: 106–15.

- [23] Cascieri MA, Springer M. The chemokine/chemokine-receptor family: potential and progress for therapeutic intervention. *Curr Opin Chem Biol* 2000; 4: 420–7.
- [24] Lucey DR, Clerici M, Shearer GM. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic and inflammatory diseases. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 532–62.
- [25] Trinchieri G. Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN-gamma). *Curr Opin Immunol* 1997; 9: 17–23.
- [26] Doherty TM. T-cell regulation of macrophage function. *Curr Opin Immunol* 1995; 7: 400–4.
- [27] LeGros G, Erard F. Non-cytotoxic, IL-4, IL-5, IL-10 producing CD8+ T cells: their activation and effector functions. *Curr Opin Immunol* 1994; 6: 453–7.
- [28] Brion CA. Cytokines in the generation of immune responses to, and resolution of, virus infection. *Curr Opin Immunol* 1994; 6: 530–8.
- [29] LeDuc JW, Ksiazek TG, Rossi CA, Dalrymple JM. A retrospective analysis of sera collected by the hemorrhagic fever commission during the Korean conflict. *J Infect Dis* 1990; 162: 1182–4.
- [30] Wright SP. Adjusted p-values for simultaneous inference. *Biometrics* 1992; 48: 1005–13.
- [31] Statistica for Windows (Computer program Manual). [StatSoft I]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc.; 1995.
- [32] Cinco M, Vecile E, Murgia R, Dobrina P, Dobrina A. *Leptospira interrogans* and *Leptospira peptidoglycans* induce the release of tumor necrosis factor from human monocytes. *FEMS Microbiol Lett* 1996; 138: 211–4.
- [33] Yang CW, Wu MS, Pan MJ, Hong JJ, Yu CC, Vandewalle A, i sur. *Leptospira* outer membrane protein activates NF-kappaB and downstream genes expressed in medullary thick ascending limb cells. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 2017–26.
- [34] Yang CW, Wu MS, Pan MJ. *Leptospirosis* renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16(Suppl.5):73–7.
- [35] Diament D, Brunialti MK, Romero EC, Kallas EG, Salomao R. Peripheral blood mononuclear cell activation induced by *Leptospira interrogans* glycolipoprotein. *Infect Immun* 2002; 70: 1677–83.
- [36] Kyriakidis I, Samara P, Papa A. Serum TNF- α , sTNFR1, IL-6, IL-8 and IL-10 levels in Weil's syndrome. *Cytokine* 2011, u tisku.
- [37] Krakauer T, LeDuc JW, Krakauer H. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1, and interleukin-6 in hemorrhagic fever with renal syndrome. *Viral Immunol* 1995; 8: 75–9.
- [38] Linderholm M, Ahlm C, Settergren B, Waage A, Tärnvik A. Elevated plasma levels of tumor necrosis factor (TNF)-alpha, soluble TNF receptors, interleukin (IL)-6, and IL-10 in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. *J Infect Dis* 1996; 173: 38–43.
- [39] Markotić A, Rabatić S, Gagro S, Sabioncello A, Kuzman I, Dekaris D. Immunopathogenesis of hemorrhagic fever with renal syndrome in humans. U: Salluzo JF, Dodet B. *Emergence and control of rodent-borne viral diseases (hantaviruses and arenaviruses)*. Paris, France: Elsevier; 1999, str. 125–31.
- [40] Cebalo Lj, Markotić A. Chemokine Production Predominates in Human Monocytes Infected with Tula Virus. *Viral Immunology* 2007; 20: 206–13.
- [41] Markotić A, Hensley L, Daddario K, Spik K, Anderson K, Schmaljohn C. Pathogenic hantaviruses elicit different immunoreactions in THP-1 cells and primary monocytes and induce differentiation of human monocytes to dendritic-like cells. *Coll Antropol* 2007; 31: 1159–67.
- [42] Segerer S, Nelson PJ, Schlöndorff D. Chemokines, chemokine receptors and renal disease. From basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 152–76.
- [43] Ou ZL, Natori Y, Natori Y. Gene expression of CC chemokines in experimental acute tubulointerstitial nephritis. *J Lab Clin Med* 1999; 133: 41–7.
- [44] Panisadee A, Malasit P, Seliger B, Bhakdi S, Husmann M. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation and apoptosis. *J Immunol* 1998; 161: 6338–46.
- [45] Mantovani A, Bussolino F, Introna M. Cytokine regulation of endothelial cell function. From molecular level to the bedside. *Immunol Today* 1997; 18: 231–40.