

УДК: 616.988: 578.825]-092.19-036.12

## СТАН СПЕЦИФІЧНОГО ІМУНІТЕТУ ПРИ ХРОНІЧНІЙ ЕПШТЕЙНА-БАРР ВІРУСНІЙ ІНФЕКЦІЇ

ПОКРОВСЬКА Т. В.

Національний медичний університет імені Данила Галицького, м. Львів

Епштейна-Барр вірус (EBV) відомий не тільки як збудник інфекційного мононуклеозу, лімфоми Беркіта і носоглоткової карциноми, але має значення у розвитку аутоімунної патології та синдрому хронічної втоми [1, 2]. Інфікованість вірусом охоплює біля 90% населення [5].

В останні роки спостерігається ріст вперше діагностованих випадків хронічної EBV-інфекції [4, 6]. Це пов'язано, як з імунодепресією, яка зумовлена несприятливими різноманітними несприятливими факторами [1, 11], так і впровадженням нових методів лабораторної діагностики EBV-інфекції [2]. Відкритим залишається питання про те, чи можна розглядати персистенцію EBV в макроорганізмі як форму своєрідного симбіозу, чи вона пов'язана з індукцією імунодефіцитного стану, механізми якого продовжують вивчатися.

При EBV-інфекції змінюються параметри природженого та адаптивного імунітету, динаміка яких найбільше вивчена при гострій формі EBV-інфекції, водночас у доступній літературі надзвичайно мало даних про реактивацію хронічної EBV-інфекції, особливо у підлітків [5, 6, 7, 8, 9, 10, 11]. Значний ріст атипичних форм EBV-інфекції серед населення, різноманітність думок про причини їх виникнення, невизначеність при виборі метода виявлення EBV-інфекції і складності при інтерпретації результатів лабораторних досліджень, обмеженість даних про взаємозв'язок показників природженої та адаптивної ланок імунної відповіді, цитокінового профілю при хронічній EBV-інфекції, вказують на актуальність теми і слугують основою для проведення даного дослідження.

**Мета дослідження:** дослідити особливості природженого та адаптивного імунітету, цитокінового профілю у підлітків, хворих на хронічну EBV-інфекцію.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Під спостереженням було 66 хворих віком від 14 до 17 років на хронічну EBV-інфекцію (основна група), які лікувалися у Львівській обласній інфекційній клінічній лікарні протягом 2010-2012 рр. Серед пацієнтів було 38 дівчат (57,6%), та 28 хлопців (42,4%). В контрольну групу увійшло 20 здорових осіб тотожних за віком і статтю до пацієнтів основної групи, яким були проведені загальноклінічні та імунологічні обстеження.

Клініко-лабораторними ознаками включення пацієнтів до групи з хронічною EBV-інфекцією

були: збільшення лімфатичних вузлів, субфебрилітет, зміни з боку слизової оболонки рото- і носоглотки (рецидивуючі ринофарингіти, синусити, часті загострення хронічного тонзиліту), біль у м'язах і суглобах. У деяких хворих відмічалось збільшення печінки і селезінки. Окрім цього, майже у всіх хворих спостерігалися астено-вегетативні прояви: швидка втомлюваність, загальна слабкість, емоційна лабільність, депресивний стан, безсоння, які утримувалися більше 6 місяців, певні гематологічні зміни (лейкопенія або помірний лейкоцитоз, лімфомоноцитоз), результати серологічних досліджень.

Всім хворим були проведені загальноприйняті в клінічній практиці дослідження згідно офіційних рекомендацій: загальний аналіз крові, сечі, калу, бактеріологічні, біохімічні, інструментальні дослідження. Антитіла до антигенів EBV виявляли методом ІФА (до капсидного антигену вірусу – VCA IgM і VCA IgG, до раннього антигену – EA IgG та до ядерного антигену – EBNA IgG), використовуючи діагностичні тест-системи виробництва "Вектор-Бест" (м. Новосибірськ, РФ). Антитіла IgM і IgG до білків ВПГ 1/2, а також IgM та IgG до ЦМВ визначалися методом ІФА за допомогою тест-системи "Вектор-Бест" (м. Новосибірськ, РФ). Виявлення ДНК EBV проводили методом ПЛР у зішкрябі слизової оболонки задньої стінки глотки, слини і крові із застосуванням набору реагентів фірми "ДНК-технології" (м. Москва).

Дослідження клітинної ланки імунітету включало визначення субпопуляцій лімфоцитів CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>/56<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>. Розраховували імунорегуляторний індекс – CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>. Фенотипічний спектр лімфоцитів периферичної крові у хворих досліджували методом проточної цитометрії. Вимірювання проводилося на проточному цитометрі FACS Calibur ("Becton Dickinson", США). Рівень сироваткових цитокінів визначали за допомогою твердофазного ІФА, використовуючи тест-системи для визначення рівня IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-10 виробництва фірми "Протеїновий контур" (м. Санкт-Петербург).

Статистичну обробку й аналіз отриманих даних проводили за загальноприйнятими методами варіаційної статистики. Статистична обробка результатів виконувалася за допомогою пакету програм "STATISTICA FOR WINDOWS 6.0" (Statsoft, USA).

**РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ**

Клініка хронічної EBV-інфекції найчастіше характеризувалася розвитком наступних синдромів: лімфопроліферативного у 39 пацієнтів (59,1%), інтоксикаційного – у 37 осіб (56,0%), астеновегетативного – у 66 хворих (100%), кардіального – у 29 осіб (43,9%,) та артралгічного – у 34 осіб (51,5%). Гепатолієнальний синдром спостерігався у 18 пацієнтів (27,3%). У більшості хворих ці синдроми були поєднані. З анамнезу захворювання відомо, що протягом попередніх 6 місяців у 24 пацієнтів (36,3%) відмічений тривалий субфебрилітет, нездужання, слабкість, підвищена втомлюваність. Гіперплазія мигдаликів, збільшення лімфатичних вузлів і селезінки утримувалися у 21 пацієнта (31,8%). Явища хронічного ринофарингіту, які проявлялися затрудненням носовим диханням, першінням в горлі, зернистістю задньої стінки глотки відмічено у 14 хворих (21,2%). Збільшення і пальпаторна болючість слинних залоз була відмічена у 3 пацієнтів (4,5%).

У 53 пацієнтів (80,3%) виявили VCA IgG, у 59 осіб (89,4%) – EBNA IgG, що підтверджувало хронічну EBV-інфекцію. Частота виявлення EA IgG складала 10,6%. Виявлення VCA IgG, EBNA IgG одночасно з EA IgG у пацієнтів є відображенням активації хронічного процесу. “Ізольоване” виявлення VCA IgG в 3 осіб (4,5%) та EBNA IgG у 7 підлітків (10,6%) можна інтерпретувати як стадію перенесеного інфекційного мононуклеозу (паст-інфекція).

При хронічній EBV-інфекції DNA EBV найчастіше виявлялась у зішкрябах слизової задньої стінки глотки - у 75,7% підлітків, в слині – у 9,1%, в крові – у 6,1% хворих, в декількох біосередовищах одночасно – в 9,1% підлітків.

**Лейкоцитарна формула периферичної крові у хворих на хронічну EBV-інфекцію.**

Кількість лейкоцитів в периферичній крові у хворих на хронічну EBV-інфекцію, була нижчою (в середньому 6,28±0,14 Г/л), порівняно з контрольною групою (в середньому 6,53±0,25 Г/л, p>0,05), що не є вірогідним (таблиця 1).

Таблиця 1

**Загальна кількість лейкоцитів периферичної крові і лейкограма у хворих на хронічну EBV-інфекцію (M±m)**

Показники		Основна група n = 66	Контрольна група n = 20
Лейкоцити	Г/л	6,28±0,14	6,53±0,25
Еозинофіли	%	2,24±0,34	1,40±0,30
	Г/л	0,31±0,06	0,20±0,04
Паличкоядерні лейкоцити	%	3,85±0,24 1	2,70±0,19
	Г/л	0,23±0,02 2	0,16±0,02
Сегментоядерні лейкоцити	%	42,03±1,56 1	55,20±1,20
	Г/л	2,55±0,12 2	3,03±0,17
Лімфоцити	%	38,09±0,72 2	34,40±1,58
	Г/л	2,35±0,08	2,24 ±0,15
Моноцити	%	8,42±0,76 1	5,95±0,51
	Г/л	0,52±0,02 1	0,32±0,02

Примітки: 1 – p<0,01 – порівняно з показниками контрольної групи;

2 –p<0,05 – порівняно з показниками контрольної групи.

Число паличкоядерних нейтрофілів як в абсолютних, так і у відносних числах (p<0,01) було вірогідно вищим у хворих, порівняно із здоровими особами. Кількість сегментоядерних нейтрофілів як у відносних, так і в абсолютних числах була вірогідно меншою, ніж у здорових осіб. У пацієнтів з основної групи вміст лімфоцитів в периферичній крові виявився вірогідно

вищим при співставленні відносних показників (38,09±0,72%, p<0,05), порівняно з контрольною групою (відповідно 34,40±1,58% і 2,24±0,15 Г/л). У більшості хворих абсолютні і відносні показники моноцитів були вірогідно вищими порівняно із показниками здорових осіб (p<0,01). Атипові мононуклеари у хворих на хронічну EBV-інфекцію не виявлялися.

**Фенотипічні особливості лімфоцитів у хворих на хронічну EBV-інфекцію.** Нами виявлено, що в періоді загострення хронічної EBV-інфекції розвивається своєрідний імунопато-

логічний комплекс, який перебігає з ознаками певного дефіциту Т-клітинної ланки імунної системи (Табл. 2).

Таблиця 2

**Показники лімфограми у хворих на хронічну EBV-інфекцію (M±m)**

Показник		Основна група (n = 66)	Контрольна група (n = 20)
Лімфоцити	%	38,10±0,57	34,40±1,78
	Г/л	2,35±0,08	2,24±0,15
Т-лімфоцити (CD3+ )	%	60,50 ±0,60	72,90±1,01
	Г/л	1,41 ±0,05	1,61 ±0,10
Т-хелпери (CD4+ )	%	39,00 ±0,54	48,60±1,47
	Г/л	0,59 ±0,021	0,78±0,04
Т-цитотоксичні лімфоцити (CD8+ )	%	22,50 ±0,74	24,30±0,98
	Г/л	0,32±0,01 1	0,37 ±0,02
NK (натуральні кілерні) клітини (CD16+ /56+)	%	19,30 ±0,38	11,10±0,51
	Г/л	0,45±0,022	0,24 ±0,01
В-лімфоцити (CD19+ )	%	12,70±0,27	9,60±0,59
	Г/л	0,29 ±0,01 2	0,21±0,01
Імуно-регуляторний індекс CD4+/CD8+		1,85±0,07	2,33±0,27

Примітки: <sup>1</sup> – p<0,05 – порівняно з показниками контрольної групи;  
<sup>2</sup> – p<0,01 – порівняно з показниками контрольної групи.

Спостерігалось кількісне зменшення популяції CD3<sup>+</sup>-лімфоцитів (1,41±0,05 Г/л) порівняно із здоровими особами (1,61±0,10 Г/л, p>0,05). Виявлено суттєве зниження вмісту CD4<sup>+</sup>-лімфоцитів, які володіють хелперно-індукторними властивостями (0,59±0,02 Г/л) порівняно із контрольною групою (0,78±0,06 Г/л, p<0,01). Дисбаланс між субпопуляціями Т-лімфоцитів характеризувався зниженням кількості CD8<sup>+</sup>-лімфоцитів, які володіють супресорно-цитотоксичним ефектом (0,32±0,01 Г/л, p<0,05) порівняно з особами контрольної групи (0,37±0,02 Г/л). Кількість CD16<sup>+</sup>/56<sup>+</sup> – натуральних кілерних клітин була вірогідно вищою (0,45±0,02 Г/л), порівняно зі здоровими особами (0,24±0,01 Г/л, p<0,01), що, ймовірно, вказує на тривалу персистенцію вірусу в організмі. Вміст CD19<sup>+</sup>-лімфоцитів у крові був вірогідно вищим (0,29±0,01 Г/л), порівняно з контрольною групою (0,21±0,01 Г/л, p<0,01), що дозволяє припустити думку про можливість потенціювання аутоімунного компонента патологічного процесу. Як видно з поданих даних таблиці 2, співвідношення CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> у пацієнтів є меншим, ніж у осіб контрольної групи (відпо-

відно 1,85±0,07 і 2,33±0,27), що може вказувати на тенденцію формування в них вторинних імуннодефіцитних порушень.

**Дослідження цитокинової регуляції.** Результати досліджень цитокинової регуляції у 66 хворих на хронічну EBV-інфекцію показали, що важливою патогенетичною ланкою, яка лежить в основі несприятливого перебігу хвороби, є дисбаланс продукції про- і антизапальних цитокинів, зумовлений порушенням регуляції імунної відповіді.

EBV володіє великим набором генів, які дають йому можливість уникати імунної відповіді людини, а саме, EBV виробляє білки-аналоги інтерлейкінів і їх рецептори, які змінюють імунну відповідь. В періоді активного розмноження вірус продукує IL-10-подібний білок, який пригнічує Т-клітинний імунітет, функцію цитотоксичних лімфоцитів, макрофагів, порушуючи всі етапи функціонування натуральних кілерів (тобто важливих систем протівірусного захисту). Таким чином, розмноження EBV в організмі людини може слугувати причиною виникнення вторинного імуннодефіциту.

Рівні регуляторних цитокінів у сироватці крові підлітків хворих на хронічну EBV-інфекцію мали свої особливості (рис. 1).

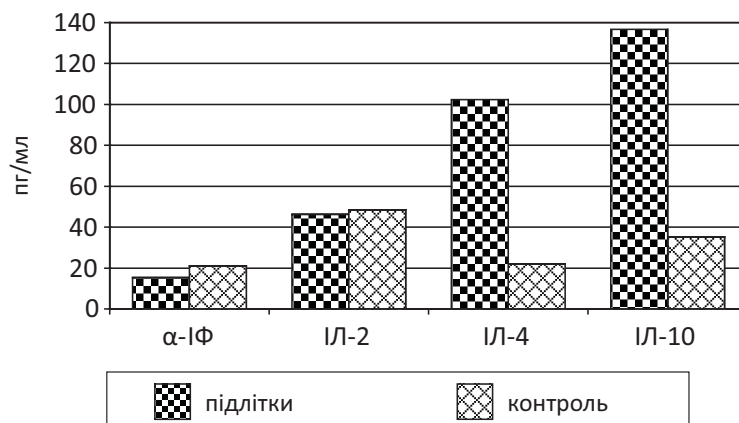


Рис. 1. Середній рівень регуляторних цитокінів у сироватці пацієнтів на хронічну EBV-інфекцію в періоді загострення хвороби (1 тиждень).

Найбільш інформативним показником Т-хелперної відповіді першого типу (Th-1) був прозапальний цитокін IFN- $\alpha$ , концентрація якого у періоді загострення була вірогідно нижчою у пацієнтів і дорівнювала в середньому  $15,41 \pm 0,75$  пг/мл у порівнянні з даними контрольної групи ( $21,14 \pm 2,63$  пг/мл,  $p < 0,05$ ) (рис. 1). Рівень концентрації ІЛ-2 у сироватці хворих також був низьким (не перевищував референтних) порівняно з контрольною групою ( $p > 0,05$ ). Відомо, що ІЛ-2 відіграє ключову роль в індукції клітинної ланки імунітету. Отже, знижені показники рівня цього цитокіну в сироватці крові, який є основним фактором росту Т-лімфоцитів, свідчать про недостатню повноцінність клітинної ланки імунної відповіді у пацієнтів на хронічну EBV-інфекцію. Зменшення продукції IFN- $\alpha$  та ІЛ-2 вказує на депресію Th-1 типу, що створює умови для персистенції EBV, збереженню віремії, низьку здатність індукувати синтез інтерферону, внаслідок чого не забезпечується необхідний рівень протівірусного захисту [9]. Зменшення вмісту IFN- $\alpha$  та ІЛ-2 супроводжувалося одночасним підвищенням вмісту таких антізапальних цитокінів, як ІЛ-4 та ІЛ-10 у хворих.

Показники сироваткових ІЛ-4 у пацієнтів на хронічну EBV-інфекцію майже в 5 разів, ІЛ-10 – в 4 рази більше порівняно з контрольною групою. Високий вміст цих цитокінів у сироватці крові вказує на значний вплив Т-хелперної відповіді другого типу (Th-2-лімфоцитів) і перевагу реакцій гуморального типу. Ці цитокіни проявляють протизапальну дію, що, ймовірно пов'язано з їх здатністю інгібувати функції Th-1 та пригнічувати продукцію IFN- $\alpha$ . Незбалансованість у системі цитокінового регуляторного ланцюга є ключовою ланкою імунопатологічних порушень при хронічній EBV-інфекції.

Таким чином, імунні порушення при EBV-інфекції носять комплексний характер, вони

стосуються як природженого, так і адаптивного імунітету і, можливо, сприяють формуванню хронічного перебігу.

Відомо, що перебіг EBV-інфекції залежить від стану імунної системи макроорганізму, при цьому протівірусний імунітет значною мірою залежить від продукції цитокінів. Кінцевий результат біологічної дії цитокінів визначається їх кількісним вмістом, тимчасовою послідовністю синтезу різних цитокінів, взаємодією між собою. Отримані дані показали, що умовою формування рецидивуючого і хронічного перебігу EBV-інфекції є неадекватна цитокінова відповідь у фазі загострення, яка характеризується недостатньою активацією синтезу прозапальних цитокінів IFN- $\alpha$  та ІЛ-2, при посиленій секреції антізапальних цитокінів Th-2 типу ІЛ-4 та ІЛ-10.

## ВИСНОВКИ

1. Клініка хронічної EBV-інфекції найчастіше характеризувалася розвитком лімфопроліферативного (58,3%), інтоксикаційного (58,3%), астеновегетативного (65,0%), кардіального (46,7%) та артралгічного (55,0%) синдромів, які утримувалися 6 і більше місяців з різним ступенем вираженості.
2. У періоді загострення хронічної EBV-інфекції розвивається своєрідний імунопатологічний комплекс, який перебігає з ознаками певного дефіциту Т-клітинної ланки імунної системи. Імунорегуляторний індекс у підлітків в 1,2 рази менший, ніж у осіб контрольної групи, що може вказувати на тенденцію формування в них вторинних імунodefіцитних порушень.
3. Отже, у хворих на хронічну EBV-інфекцію є неадекватна цитокінова відповідь у фазі загострення, яка характеризується недостатньою активацією синтезу прозапальних цитокінів



IFN- $\alpha$  та ІЛ-2, при посиленій секреції антизапальних цитокинів Th-2 типу ІЛ-4 та ІЛ-10, що відіграє важливу роль в імунопатогенезі хронізації та прогресуванні ВЕБ-інфекції.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Горейко Т. В. Роль цитокинов в патогенезі хронічної інфекції, викликаній вірусом Епштейна-Барр / Т.В. Горейко, Н.М. Калинина // Цитокини и воспаление. – 2011. – № 4. – С. 50-54.
2. Иммунологическая характеристика впервые возникшей герпетической инфекции / Т. И. Долгих, А. В. Ершов, Е. Ю. Минакова, Н. С. Запарий // Инфекционные болезни. – 2010. – Т. 8, № 1, с. 25-28.
3. Казмирчук В. Е. Диагностика и лечение инфекции вызванной Эпштейна-Барр вирусом / В. Е. Казмирчук, Д. В. Мальцев // Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія. – 2011. – №2. – С. 30-36.
4. Клинические формы хронической Эпштейна-Барр вирусной инфекции: вопросы диагностики и лечения / И. К. Малашенкова, Н. А. Дидковский, Ж. Ш. Сарсания [и др.] // Новости медицины и фармации в Украине. – 2007. – №13. – С. 20-21.
5. Крамарев С. А. Хроническая Эпштейна-Барр вирусная инфекция у детей : клинические проявления, диагностика, лечение с использованием препарата Липоферон / С. А. Крамарев, О. В. Выговская // Клінічна імунологія, Алергологія, Інфектологія. – 2010. – № 9-10. – С. 26-32.
6. Покровська Т. В. Стан цитокинової регуляції у пацієнтів, хворих на хронічну Епштейна-Барр вірусну інфекцію / Т. В. Покровська, В. В. Чоп'як // Therapia. – 2009. – № 1. – С. 23-27.
7. Покровська Т.В. Особливості фенотипічного спектру лімфоцитів у хворих на гостру та хронічну Епштейна-Барр вірусну інфекцію / Т.В. Покровська, О.М. Зінчук // Вісник морфології. – 2011. – Т. 17, № 3. – С. 624-628.
8. Junker A. K. Epstein-Barr virus / A. K. Junker // Pediatrics in Review. – 2005. – V. 26. – P.79-85.
9. Human peripheral blood and bone marrow Epstein-Barr virus-specific T-cell repertoire in latent infection reveals distinct memory T-cell subsets / M. Guerreiro, Na IK, A. Letsch, D. Haase [et al.] // Eur J Immunol. – 2010 Jun. – Vol. 40, N6. – P.1566-1576.
10. Murray P. G. The role the Epstein-Barr virus in human disease / P. G. Murray, L. S. Young // J. Frontiers Bioscience. – 2007. – V. 7. – P. 519-540.

11. Schooley R. T. Epstein-Barr virus infection. – 23-rd. ed. / R. T. Schooley. – Goldman : Cecil Medicine, 2007. – P. 360-366.

## РЕЗЮМЕ

### СОСТОЯНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ЭПШТЕЙНА-БАРР ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Покровская Т. В.

Национальный медицинский университет имени Данила Галицкого, г. Львов

Проведено клиническое наблюдение за 66 больными с хронической Эпштейна-Барр вирусной инфекцией (подростки в возрасте 14-17 лет). Выявлены клинико-лабораторные особенности течения болезни. Изучены показатели врожденного и приобретенного иммунитета. В периоде обострения хронической EBV-инфекции развивается своеобразный иммунопатологический комплекс с признаками дефицита Т-клеточного звена иммунитета.

Изучено патогенетическое и клиническое значение провоспалительных (IFN- $\alpha$ , IL-2) и противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов у больных с EBV-инфекцией. У больных выявлено снижение концентрации IFN- $\alpha$  и IL-2, по сравнению с контрольной группой и повышение концентрации в крови IL-4, IL-10. Дисбаланс в системе цитокинового регуляторного звена является ключевым звеном иммунологических нарушений при EBV-инфекции, а несбалансированность продукции цитокинов Th-1-го и Th-2-го типов играет важную роль в иммунопатогенезе хронизации и прогрессировании EBV-инфекции

**Ключевые слова:** хроническая EBV-инфекция, подростки, цитокины, лимфоциты.

## SUMMARY

### THE STATUS OF THE PATIENTS'S SPECIFIC IMMUNITY WITH CHRONIC EPSTEIN-BARR VIRUS INFECTION

Pokrovska T.V.

Lviv National Medical University named after Danylo Galitsky

66 patients with chronic Epstein-Barr virus (EBV) infection were kept under observation. Toxicity, lymphoid tissue proliferation, cardiac and arthritic syndromes were observed more often in teenagers with chronic EBV infection. IL-4, IL-10 levels were increased significantly ( $p < 0,001$ ) in all patients with chronic EBV infection compare the control group. Proinflammationally cytokines concentrations (IFN- $\alpha$ , IL-2) were decreased ( $p < 0,001$ ). Obtained results pointed out an important role of disturbances of Th1/Th2 balance of cytokine production in immunopathogenesis of chronic EBV infection which promote persistence of EBV-infection and progressing chronic courts of disease.

**Key words:** chronic EBV infection, teenagers, cytokines.