

ДИСФУНКЦІЯ КЛІТИННОГО ІМУНІТЕТУ В ДІТЕЙ ІЗ ХРОНІЧНОЮ ПЕРСИСТУЮЧОЮ ГЕРПЕСВІРУСНОЮ ІНФЕКЦІЄЮ

Д-р мед. наук А. Ю. Волянський, канд. біол. наук О. А. Романова, К. С. Конорєва, Н. І. Ігумнова

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова
Національної академії медичних наук України»

Вивчено стан клітинного імунітету дітей 6–11 років із хронічним перебігом герпесвірусної інфекції, викликаної вірусами герпесу I–VI типів залежно від їх кількісного навантаження. Результати свідчать про те, що в групі дітей 6–11 років із більш високим вірусним навантаженням спостерігається багаторазове збільшення кількості T-активованих лімфоцитів ($CD25^+$) на тлі значного зниження T-лімфоцитів з маркером апоптозу ($CD3^+, CD95^+$).

Ключові слова: хронічна герпесвірусна інфекція, клітинний імунітет, діти 6–11 років.

ДИСФУНКЦІЯ КЛЕТОЧНОГО ІММУНІТЕТА У ДЕТЕЙ С ХРОНИЧЕСКОЙ ПЕРСИСТИРУЮЩЕЙ ГЕРПЕСВІРУСНОЙ ИНФЕКЦІЕЙ

Д-р мед. наук А. Ю. Волянский, канд. биол. наук Е. А. Романова,
Е. С. Конорева, Н. И. Игумнова

Изучено состояние клеточного иммунитета детей 6–11 лет с хроническим течением герпесвирусной инфекции, вызванной вирусами герпеса I–VI типов в зависимости от их количественной нагрузки. Результаты свидетельствуют о том, что в группе детей 6–11 лет с более высокой вирусной нагрузкой наблюдается многократное увеличение количества T-активированных лимфоцитов ($CD25^+$) на фоне значительного снижения T-лимфоцитов с маркером апоптоза ($CD3^+, CD95^+$).

Ключевые слова: хроническая герпесвирусная инфекция, клеточный иммунитет, дети 6–11 лет.

DYSFUNCTION OF CELLULAR IMMUNITY IN CHILDREN WITH CHRONIC PERSISTENT HERPES VIRAL INFECTIONS

A. Yu. Volyanskiy, O. A. Romanova,
K. S. Conoreva, N. I. Igumnova

Authors have investigated the state of cellular immunity of children 6–11 years with chronic herpes infection caused by the herpes virus I–VI types, depending on their load quantification.

It is performed that there is significant increase in the number of activated T-lymphocytes ($CD25^+$) against the background of a significant decrease in T-lymphocytes with apoptosis marker ($CD3^+, CD95^+$) in group of 6–11 years children with the high herpes infection load.

Keywords: chronic herpes virus infection, cell-mediated immunity, 6–11 years children.

Останнім часом у генезі як інфекційної, так і соматичної патології все більшого значення набувають герпесвіруси. Увага, яку вірусологи і клініцисти звертають на герпесвірусні захворювання людини, пов’язана з її значною епідеміологічною роллю і соціальною значущістю в сучасному світі. Спільнім у патогенезі всіх інфекцій, що викликаються вірусами герпесу, є їх здатність тривало персистувати в організмі, сприяючи розвитку хронічних і латентних форм інфекції з періодичними загостреннями. Водночас вірус може зберігатися в клітинах у вигляді провірусу, який інтегрує у геном клітини [4].

Доведено, що всі відомі герпесвірусні інфекції можуть рецидивувати [2, 7]. Важлива властивість герпесвірусів – здатність після первинного інфікування в дитячому віці довічно персистувати в організмі і реактивуватися під впливом різних екзо- та ендогенних провокативних чинників. Невпинне зростання

рівня герпесвірусних захворювань у дітей зумовлює необхідність усебічного вивчення їх клінічних проявів, удосконалення методів діагностики та розробки ефективних підходів до їх профілактики та терапії. Персистуюча герпесвірусна інфекція викликає виражені імунологічні зміни [9]. Інтерес до стану імунокомпетентних клітин за вірусної інфекції зумовлений не лише тим, що вони беруть безпосередню участь у реалізації інфекційного процесу, а й тією обставиною, що ці клітини самі є мішенню для дії персистуючих вірусів [6]. На думку деяких авторів [11, 12], у патогенезі рецидивуючих форм інфекції велику роль відіграють пригнічення чинників місцевого імунітету, а також генетично детермінований дефіцит клітинного імунітету. В умовах ослабленого імунологічного контролю відбувається безперешкодне поширення вірусу від клітини до клітини по міжклітинних «містках» або екстрацелюлярно. Дослідження останнього часу довели імуносупресивні

властивості герпесвірусів, спрямованих на зниження функціональної активності Т-лімфоцитів, природних кілерів, макрофагів, продукції антитіл, інтерлейкінів, інтерферонів, активності цитотоксичності Т-ефекторів.

Незважаючи на те, що роль герпесвірусної інфекції в патогенезі інфекційних захворювань загально-визнана [5], дослідень, присвячених виявленню безпосереднього зв'язку формування цієї патології з ДНК-вмісними вірусами, нечисленні [1, 3]. Також недостатньо вивчені патогенетичні, імунологічні й клінічні особливості герпеспотенційованих інфекційних захворювань, унаслідок чого сучасні лікувальні та профілактичні заходи потребують подальшого вдосконалення задля підвищення їх ефективності. Усе це зумовлює необхідність детального вивчення патогенетичної ролі герпесвірусів у формуванні особливостей перебігу інфекційних захворювань, що дасть змогу розробити адекватні методи їх профілактики й лікування.

Мета роботи — вивчення стану клітинного імунітету дітей 6–11 років із хронічним перебігом герпесвірусної інфекції, викликаної вірусами герпесу I–VI типів, залежно від їх кількісного навантаження.

Роботу виконано в рамках НДР ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України» «Імунологічні аспекти феномену вірусної перsistенції».

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Проведено імунологічне обстеження 25 дітей, хворих на хронічну герпесвірусну інфекцію (ХГВІ) внаслідок інфікування вірусами герпесу I–VI типів віком 6–11 років, які консультувалися в дитячому медичному центрі «Your Baby» протягом 2013 р. У цій категорії дітей були окремо розглянуті дві групи: 1 група — діти, у лейкоцитах яких було виявлено I–II типи герпесвірусів ($n=14$); 2 група — діти, у лейкоцитах яких було виявлено 3 та більше типів герпесвірусів ($n=11$). Контрольна група складає загалом 9 дітей відповідного віку.

Клінічні прояви зазначеного захворювання полягали у частих (4 рази на рік та більше) епізодах ГРЗ/ГРВІ з ураженням верхніх дихальних шляхів (тонзиліти, тонзилофарингіти, риносинусити, бронхіти), скаргах на епізоди підвищення температури до субфебрильних значень на тлі задовільного самопочуття дитини. В об'єктивному статусі дітей визначалися збільшення лімфатичних вузлів шийної ділянки, зернистість задньої стінки глотки, гіпертрофія піднебінних мигдаликів. Об'єктом дослідження була периферична кров дітей. Типи та відсоток герпесвірусів у лейкоцитах було досліджено в реакції імунофлюресценції (РІФ) із використанням моноклональних антитіл (МКАТ) для виявлення цитоплазматичних антигенів. Застосовували антитіла проти вірусів герпесу I–VI, мічені флуоресцеїнами.

Лімфоцити для дослідження отримували з периферичної крові, використовуючи градієнт щільності фікол-верографину 1,078 г/мл. Популяційний та субпопуляційний вміст лімфоцитів периферичної крові визначали за допомогою діагностикуму еритроцитарного для виявлення субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів людини таких імунофенотипів: CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺, CD21⁺, CD HLA-DR⁺ виробництва фірми ТОВ НВЛ «Гранум» (Харків).

Кількісне визначення активованих лімфоцитів фенотипу CD25⁺ та лімфоцитів із маркером апоптозу CD3⁺, CD95⁺ разом із загальною кількістю Т-лімфоцитів CD3⁺ проводили за допомогою проточної цитофлуориметрії на приладі FACS Calibur (BD, США) з відповідним програмним забезпеченням Cell Quest — налаштованою універсальною програмою для цитометричних досліджень. Абсолютну кількість різних типів каріоцитів у лейкограмі підраховували морфологічно, враховуючи не менше ніж 200 клітин у препараті, пофарбованому за Романовським–Гімзе. Спонтанну та ФГА-індуковану бласттрансформацію лімфоцитів вивчали у культурі клітин *in vitro* у реакції бласттрансформації лімфоцитів (РБТЛ) [8]. Інтенсивність проліферації клітин оцінювали морфологічно за відносним вмістом формованих бластних форм лімфоцитів, ураховуючи не менше 200 клітин на препарат.

Отримані дані піддавали статистичній обробці з використанням пакету прикладних програм Statgraphics. Для виявлення значущих відмінностей показників, що порівнювалися, використовували t-критерій Ст'юента [10]. Розбіжності вважали достовірними за рівня значень $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Під час дослідження клітинного імунітету дітей 6–11 років хворих на хронічну герпесвірусну інфекцію (табл. 1) насамперед привертає увагу така картина показників. Передусім загальна чисельність лейкоцитів периферичної крові у досліджуваних групах не мала достовірних відхилень від показника здорових дітей, хоча друга група з ХГВІ все ж демонструвала тенденцію до зниження загальної кількості каріоцитів.

Зміненими щодо контролю рисами лейкограм обох груп дітей із ХГВІ, що відрізнялися ступенем навантаження різними вірусними антигенами, були лише достовірне зниження питомої ваги й абсолютних значень кількості моноцитарних клітин у 1 групі й еозинофільних гранулоцитів — в обох групах, що підлягали обстеженню.

Що стосується складу лімфоїдних субпопуляцій, відмінність їх значень виявилася характерною лише для групи хворих на ХГВІ з множинним антигенним навантаженням, до того ж як до контролю, так і до паралельної групи (1–2 вірусних антигени) (табл. 1). Так, абсолютна кількість загальної популяції лімфоцитів дітей 2 групи демонструвала чітку

Таблиця 1

**Показники клітинного імунітету дітей 6–11 років, хворих на ХГВІ,
з різним ступенем вірусного навантаження лейкоцитів ($M \pm m$)**

Клітини крові та субпопуляції лімфоцитів	Група контролю (n = 9)	1 група (n = 14)	2 група (n = 11)
Лейкоцити, абс., $\times 10^9/\text{л}$	(6,6 \pm 0,8)	(6,7 \pm 0,7)	(5,7 \pm 0,6)
Лімфоцити, відн., % абс., $\times 10^9/\text{л}$	(34,5 \pm 3,0) (2,3 \pm 0,3)	(39,2 \pm 3,8) (2,6 \pm 0,3)	(36,2 \pm 3,1) (2,01 \pm 0,2)**
Моноцити, відн., % абс., $\times 10^9/\text{л}$	(8,1 \pm 1,0) (0,53 \pm 0,06)	(5,5 \pm 0,07)* (0,37 \pm 0,04)*	(7,7 \pm 0,08)** (0,44 \pm 0,03)**
Нейтрофільні гранулоцити, відн., % абс., $\times 10^9/\text{л}$	(56,0 \pm 6,0) (3,7 \pm 0,3)	(51,0 \pm 5,3) (3,4 \pm 0,3)	(51,5 \pm 4,9) (2,9 \pm 0,2)*
Еозинофільні лейкоцити, відн., % абс., $\times 10^9/\text{л}$	(1,2 \pm 0,1) (0,08 \pm 0,01)	(4,2 \pm 0,05)* (0,28 \pm 0,02)*	(4,5 \pm 0,04)* (0,26 \pm 0,02)*
T-лімфоцити (CD3 ⁺), відн., % абс., $\times 10^9/\text{л}$	(65,0 \pm 6,1) (1,5 \pm 0,1)	(56,3 \pm 5,3) (1,5 \pm 0,1)	(52,0 \pm 5,4)* (1,0 \pm 0,08)*, **
CD4 ⁺ -лімфоцити, відн., % абс., $\times 10^9/\text{л}$	(38,0 \pm 3,1) (0,86 \pm 0,09)	(35,3 \pm 3,0) (0,88 \pm 0,09)	(33,5 \pm 2,8) (0,67 \pm 0,08)*, **
T-цитотокс. (CD8 ⁺), відн., % абс., $\times 10^9/\text{л}$	(20,0 \pm 2,0) (0,46 \pm 0,05)	(21,0 \pm 2,4) (0,55 \pm 0,05)	(18,5 \pm 2,0) (0,37 \pm 0,04)*, **
T-активні (HLA-DR ⁺), відн., % абс., $\times 10^9/\text{л}$	(34,0 \pm 2,5) (0,78 \pm 0,06)	(32,8 \pm 3,0) (0,85 \pm 0,08)	(29,7 \pm 2,4) (0,60 \pm 0,07)*, **
ПК (CD16 ⁺), відн., % абс., $\times 10^9/\text{л}$	(13,8 \pm 1,2) (0,32 \pm 0,02)	(12,7 \pm 1,0) (0,33 \pm 0,02)	(12,3 \pm 0,09) (0,25 \pm 0,02)*, **
В-лімфоцити (CD21 ⁺), відн., % абс., $\times 10^9/\text{л}$	(19,0 \pm 1,5) (0,44 \pm 0,03)	(19,8 \pm 1,7) (0,51 \pm 0,04)	(19,2 \pm 1,6) (0,38 \pm 0,04)**
РБТЛ спонт., %	(5,5 \pm 0,4)	(4,8 \pm 0,5)	(3,6 \pm 0,4)*
РБТЛ інд. ФГА, %	(64,0 \pm 5,7)	(57,8 \pm 5,5)	(48,4 \pm 3,9)*

Примітки: * — $p < 0,05$ — достовірність відмінностей між показниками груп 1, 2 та контрольною групою;

** — $p < 0,05$ — достовірність відмінностей показників між 1 та 2 групами.

тенденцію до зниження порівняно з параметрами здорових дітей, а також достовірне зменшення відносно 1 групи. Абсолютна чисельність субпопуляції лімфоцитів із фенотипами CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺ хворих 2 групи була достовірно меншою від такої як у контрольній, так і 1 дослідній групах (табл. 1). Зміни у функціональній активності Т-лімфоцитів мали тенденцію до зменшення показника РБТЛ не лише стимульованої ФГА, а й спонтанної. Разом із тим, у цієї вікової категорії дітей обох груп спостерігається нормалізація чисельності Т-активних лімфоцитів HLA-DR⁺, а також популяції В-лімфоцитів, проте з тенденцією зниження у хворих на ХГВІ з множинним антигенним навантаженням.

Для отримання конкретнішої інформації про стан активації Т-лімфоїдного компартменту, який відіграє основну роль у клітинному противірусному

захисті й імунологічному нагляді, частину дітей 6–11 років, хворих на ХГВІ, було обстежено високочоточним та інформативним методом проточної цитометрії (табл. 2).

У дітей 6–11 років із ХГВІ за меншого вірусного навантаження лейкоцитів кількість CD3⁺, CD95⁺-клітин відповідала фізіологічні нормі, тоді як у разі зростання вірусної присутності вона у 3,2 разу поступалася нормальній. Можна стверджувати, що недостатність лімфоцитів Т-компартменту, що спостерігається у дітей 6–11 років, спричинюється переходом значної їх кількості до апоптозу під впливом, що відбувається за все, внутрішньоклітинно персистуючих вірусів герпесу. Водночас частка клітин, що відходять до апоптозу, співвідноситься з множинністю вірусного ураження організму. Кількісний вміст CD8⁺-лімфоцитів із цитотоксичними властивостями

Таблиця 2

**Вміст активованих лімфоцитів Т-компартменту клітинного імунітету дітей,
хворих на ХГВІ, з різним ступенем вірусного навантаження лейкоцитів ($M \pm m$)**

Субпопуляції Т-лімфоцитів, абс. ч./1 мкл	Група контролю (n = 6)	1 група (n = 12)	2 група (n = 11)
T-лімфоцити (CD3 ⁺)	(2000,5 \pm 150,6)	1884,4 \pm 94,9	1301,3 \pm 81,8 *
Активовані Т-лімфоцити з IL-2 рецептором (CD25 ⁺)	(106,0 \pm 12,3)	(90,6 \pm 9,4)**	(355,6 \pm 29,4) *
Активовані Т-лімфоцити з маркером апоптозу (CD3 ⁺ CD95 ⁺)	(615,3 \pm 31,2)	(544,0 \pm 43,4)**	(189,6 \pm 26,8) * , **

Примітки: * — $p < 0,05$ — достовірність відмінностей між показниками груп 1, 2 та контрольною групою;

** — $p < 0,05$ — достовірність відмінностей показників між 1 та 2 групами.

у групі дітей (6–11 років) демонструє однакову тенденцію від незмінності їхньої кількості у випадку меншого герпесвірусного навантаження до достовірного зниження у групах, чиї лейкоцитарні клітини уражені трьома або більше вірусами герпесу різних типів (табл. 1). Окрім того, як свідчать дослідження, у групі з підвищеним герпесвірусним навантаженням наявні виражена функціональна недостатність Т-лімфоцитів або тенденція до неї у пацієнтів із виявленими 1–2 збудниками, визначена у реакції, що оцінює потенційний бластогенез. Ураховуючи наведене, можна припустити, що, незважаючи на підвищену активацію у відповідь на стимул, яким виступає вірусний антиген, CD8⁺-клітини не можуть ні функціонально, ні кількісно забезпечити цитотоксичність стосовно нього, що може бути пов’язане з їх більш прискореним переходом до апоптичного стану і подальшою загибеллю.

ХГВІ характеризується недостатністю клітинної ланки імунітету, вірогідно, зумовленою як зменшенням тривалості життя клітин, так і зниженням вмісту деяких фенотипів імунокомпетентних одиниць, а також їх функціональної здатності.

ВИСНОВКИ

1. У дітей 6–11 років, хворих на ХГВІ, значніші зміни в кількісному складі лейкоцитів та лімфоїдних субпопуляцій спостерігаються в групах

із множинною персистенцією вірусів герпесу різних типів у лейкоцитах порівняно з пацієнтами, лейкоцити яких уражені I–II типами герпесвірусів.

2. Характерними для хворих на ХГВІ зі множинною персистенцією герпесвірусів (понад 3) різних типів усіх досліджених вікових категорій є достовірна ($p < 0,05$) кількісна недостатність клітин субпопуляцій Т-цитотоксичних (CD8⁺) та Т-активних (HLA-DR⁺) лімфоцитів, що відіграють основну роль у клітинному противірусному захисті.

3. У пацієнтів із ХГВІ спостерігається багаторазове зростання кількості Т-активованих лімфоцитів (CD25⁺): 3,3-разове — у 2 групі дітей 6–11 років на тлі значного зменшення Т-лімфоцитів із маркером апоптозу (CD3⁺, CD95⁺): у 3,2 разу — у дітей 6–11 років 1 групи.

4. Т-лімфоцити хворих на ХГВІ зі множинним (понад 3 типами) ураженням лейкоцитів вірусами герпесу різних типів мають достовірно ($p < 0,05$) зниженну функціональну здатність як до спонтанного, так і до стимульованого ФГА-blastогенезу.

Зважаючи на все зазначене, цікавими є імовірні механізми вікової компенсації недостатності клітинного імунітету за персистенції герпесвірусів, котрі потребують у *перспективі* поглиблена дослідження з метою розширення інформаційного фактажу про природу такого явища, як вірусна персистенція взагалі.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Александровский А. В. Роль иммунологических сдвигов в патогенезе герпесвирусной инфекции / А. В. Александровский, Н. И. Кудашов // Мать и дитя: материалы 2-го Рос. форума. — М., 2000. — С. 339–341.
2. Антонов П. В. Современное состояние проблемы хронических и медленных нейроинфекций / П. В. Антонов, В. А. Цинзерлинг // Архив патологии. — 2001. — № 1. — С. 47–51.
3. Аталаханов Р. Н. Конструирование инактивированных поливалентных противогерпетических вакцин / Р. Н. Аталаханов, А. В. Пичугин // Иммунореабилитация. — 1998. — № 8. — С. 193.
4. Врожденные перинатальные неонатальные инфекции / Под. ред. А. Гриноу, Д. Осборн, Ш. Сазерленд; пер. с англ. — М.: Медицина, 2000. — 288 с.
5. Галактионова О. И. Некоторые аспекты эпидемиологии Эпштейна–Барра-вирусной инфекции / О. И. Галактионова, А. П. Помогалова, Л. Н. Уразова // 8-й Съезд Всерос. общ. эпидемиологов, микробиологов, паразитологов. — М. — 2002. — Т. 1. — С. 23.
6. Иммунология инфекционного процесса: руководство для врачей / Под ред. В. И. Покровского, С. П. Гордиенко, В. И. Литвинова. — М.: Медицина, 1993. — 305 с.
7. Инфекционный мононуклеоз: клиника, патогенез, новое в диагностике и терапии / В. В. Иванова, Г. Ф. Железникова, О. А. Аксенов [и др.] // Инфекционные болезни. — 2004. — № 4. — С. 5–12.
8. Клиническая иммунология / Под. ред. А. В. Карапурова. — М.: Мед. информ. агентство, 1999. — 342 с.
9. Кологривова Е. Н. Интенсивность гуморального иммунного ответа к герпесвирусам как индикатор иммунной недостаточности организма / Е. Н. Кологривова // Микробиология, эпидемиология, иммунология. — 2000. — № 6. — С. 45–48.
10. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. — К.: Морион, 2004. — 408 с.
11. Хайтов Р. М. Современные представления о защите организма от инфекции / Р. М. Хайтов, Б. В. Пинегин // Иммунология. — 2000. — № 1. — С. 61–64.
12. Юлиш Е. И. Персистирующие герпесвирусные инфекции и их роль в заболеваемости детей из группы часто и длительно болеющих [Электронный ресурс] / Е. И. Юлиш, С. Я. Ярошенко // Здоровье ребенка. — 2013. — Т. 7. — № 50. — Режим доступа: <http://www.mif-ua.com/archive/issue-34214/>.