

## **ФЕНОТИПУВАННЯ ЛІМФОЦИТІВ ТА ЇХ АКТИВІЗАЦІЙНИХ МАРКЕРІВ У ПАЦІЄНТІВ З ХРОНІЧНОЮ ЕПШТЕЙНА-БАРР ВІРУСНОЮ ІНФЕКЦІЄЮ В СТАДІЇ РЕПЛІКАТИВНОЇ АКТИВНОСТІ**

**Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького (м. Львів)**

Дана робота є фрагментом НДР «Оцінка взаємозв'язку імунологічних, генетичних, гормональних механізмів вторинних системних васкулітів та поліімунпатології за умов системних захворювань сполучної тканини та оцінка ефективності і безпеки застосування терапії супроводу біофлавоноїдів і бігуанідів», № держ. реєстрації 011U000166.

**Вступ.** В останнє десятиріччя особлива увага акцентується на так званих «опортуністичних інфекціях», які розвиваються на тлі зниження активності імунної системи. Унікальність цих інфекцій полягає у поширеності, особливостях клінічного перебігу і стійкості до традиційної терапії. Із цієї групи інфекцій важливу роль відводять захворюванням, причинами яких є віруси герпесу, зокрема вірусу Епштейна-Барра (ЕБВ) [ 5, 13, 16, 19].

У разі проникнення ЕБВ в організм відбувається зараження клітин слизового епітелію ротоглотки (переважно мигдаликів) з одночасним зараженням В-лімфоцитів. На сьогодні достовірно доведено, що ЕБВ є тропним також до Т-лімфоцитів, NK-клітин (CD16+/56+), макрофагів, нейтрофілів, епітеліоцитів судин тощо. Причому, в епітеліоцитах ротоглотки вірус проходить повну реплікацію з утворенням великої кількості віріонів, лізисом цих клітин і вивільненням віріонів у позаклітинний простір. Водночас, у решти заражених клітинах ЕБВ знаходиться здебільшого у латентному стані і розповсюджується з імунокомпетентними клітинами периферійної крові в інші лімфоїдні тканини, уникаючи імунологічного контролю [5, 19]. Широкий спектр поліорганного тропізму вказує на різноманітність клінічних нозологічних форм, в основі яких лежить інфікування ЕБВ, тригерний вплив на маніфестацію супутньої патології, а в багатьох випадках – важкість, атипівність і стертість її перебігу тощо [9, 17, 20]. У кінцевому результаті – хронічна персистенція збудника призводить до формування вторинних імунодефіцитних станів і, відповідно, до порушень фізіологічних механізмів імунної відповіді. Тому сьогодні типовою помилкою вважається, що хронічна ЕБВ-інфекція не має клінічного значення і потребує лікування лише в імунокомпрометованих осіб [6].

Відомо, що зміни клітинної ланки природженого та набутого імунітету активно реагують на

ЕБВ-інфекцію і забезпечують основний імунологічний контроль над реплікацією вірусу. Клітинні складові природженого імунітету «озброєні» сигнальними структурами багатоступеневої системи розпізнавання еволюційно консервативних структур патогенів (PAMP). Цими структурами є група Toll-like рецепторів (TLR), які зв'язуються з PAMP, активізують систему природженого імунітету та визначають розвиток адаптивного імунітету [8]. Одними з перших клітин противірусного захисту є група кілерних клітин, зокрема NK-клітини. Це клітини, які здатні без попередньої імунізації знищувати вірусінфіковані клітини шляхом їх адгезії з наступним вивільненням вмісту азурофільних цитолітичних гранул (серинових протеаз, перфоринів, гранулізинів, білку TIA-1 [7]. Дендритні клітини у відповідь на вірусну інфекцію поглинають, перетравлюють і презентують протективні антигени збудника для розпізнавання їх наївними CD4+ і – CD8+-лімфоцитами, у результаті чого відбувається їх диференціація в Т-хелпери і Т-цитотоксичні лімфоцити (Т-ЦТЛ). Т-ЦТЛ володіють кілерною активністю щодо вірусінфікованих клітин через продукцію перфоринів, гранзимів і гранулізину [10]. Сьогодні велику роль у противірусному захисті надають функціональній здатності регуляторних клітин, які виявляють супресивну активність щодо аутоантигенів та інфекційних агентів. Найважливішими серед них є натуральні регуляторні Т-лімфоцити (Treg, CD4+/CD25+). Супресивної активності ці лімфоцити набувають при певних патологічних станах, відповідно, відіграють ключову роль у патогенезі аутоімунних хвороб, регулюють імунну відповідь на екзоантигени, в тому числі алергени. Т-лімфоцити CD4+/CD25+ пригнічують імунну відповідь Т-хелперів 1 типу на протеїни ЕБВ, сприяючи персистенції збудника, й індукують розвиток пухлин, асоційованих з ЕБВ [14, 15, 17, 18]. Цитотоксичну дію на інфіковані вірусами клітини виявляють й активовані В-лімфоцити (CD3+ /HLA-DR+). Вони продукують не лише різні типи цитотоксичних антитіл, а й широкий спектр медіаторів із цитотоксичними властивостями [6].

Велику роль у противірусному захисті відіграють клітини фагоцитарної системи – моноцити та макрофаги. Вони елімінують вірусінфіковані клітини

завдяки своїх власних ферментних систем та генерації активних метаболітів кисню, оксиду азоту та його сполук назовні, а також продукуючи низку прозапальних цитокінів, які формують вогнище запалення. На ранніх етапах розвитку протівірусного імунітету посилюють природжену та адаптивну резистентність інтерферони IFN- $\alpha$ , - $\beta$ . За рахунок активації протеїнкінази та ендонуклеази, вони пригнічують синтез і реплікацію вірусних білків, руйнують ДНК ЕБВ, активують кілерні клітини, посилюють експресію антигенів HLA I класу. Згодом включається у потівірусний захист IFN- $\gamma$ , який також гальмує вірусну реплікацію, посилює цитотоксичність моноцитів/макрофагів і NK, посилює експресію молекул HLA II класу [7].

Тому, при пошкодженні або виснаженні клітинної та гуморальної ланок імунного нагляду, в багатьох осіб спостерігаються перехід від латентної стадії хронічної ЕБВ-інфекції у стадію реплікативної активності, що в подальшому може сприяти формуванню аутоімунних, алергічних чи лімфопроліферативних процесів.

**Метою** нашої роботи була оцінка стану лімфоцитарної ланки набутого та природженого імунітету, а також визначення активності «ранніх» і «пізніх» активізаційних маркерів цих клітин у пацієнтів з різними серологічними профілями ЕБВ-інфекції.

**Об'єкт і методи дослідження.** Було обстежено 95 осіб які знаходились на амбулаторному спостереженні у Львівському регіональному медичному центрі клінічної імунології та алергології. Вік обстежених складав 20-26 рік, 52 (54,7%) – осіб жіночої і 43 (45,3%) – чоловічої статі. Всім пацієнтам проведені спеціальні лабораторні клінічні дослідження.

Матеріалом дослідження була периферійна кров, слина і зішкроб слизової задньої стінки глотки. Проведено комплексне діагностичне дослідження сироваток з визначенням серологічних маркерів ЕБВ (ЕБВ-VCA-IgM/IgG, ЕБВ-EBNA-IgG). Дослідження проводились методом імуноферментного аналізу згідно методичних рекомендацій, що додаються до стандартних наборів реактивів «ВекторВЭБ-VCA-IgG», «ВекторВЭБ-VCA-IgM», «ВекторВЭБ- EBNA-IgG» («Вектор Бест», Росія).

Молекулярно-генетичні дослідження крові, слини та зішкробу слизової задньої стінки глотки проводились методом полімеразної ланцюгової реакції згідно методичних рекомендацій, що додаються до стандартних наборів з ДНК-зондами флуоресцентно міченими ДФ-520/60-«Джин»(Росія).

Фенотипування лімфоцитів і визначення експресії основних активізаційних маркерів проводили за допомогою проточної цитофлуориметрії з використанням тест-систем фірми «Bekton Dickenson» (США).

Статистичний аналіз проводився за допомогою програм Microsoft Excel, Statistica.

**Результати досліджень та їх обговорення.** У дослідження включили пацієнтів, у яких окрім анамнестичних і низки клінічних даних були виявлені

помірні і високі титри антитіл IgG до ядерного антигену ЕБВ (ЕБВ-EBNA-IgG<sup>+</sup>). Враховували, що помірні (більше 5 разів) разів титри цих антитіл є показниками імунної пам'яті до ЕБВ і свідчать про факт інфікування в анамнезі. Водночас, високі (більше 10 разів) титри ЕБВ-EBNA-IgG<sup>+</sup> насторожують про реактивацію патогена [3]. За літературними даними відомо, що 18-20% пацієнтів після перенесеного інфекційного мононуклеозу можуть виділяти ЕБВ зі слиною до 12-18 місяців [2, 5]. Результати детального аналізу анамнестичних даних показали, що у даних пацієнтів були відсутні типові ознаки цього захворювання протягом вказаного періоду.

Пацієнтам провели дослідження на предмет виявлення ДНК вірусу з трьох різних біологічних середовищ: крові, слини, зішкробів слизової задньої стінки глотки. За результатами досліджень у 48 (51,7%) осіб виявлена ДНК EBV («+») у біологічних матеріалах, що вказує на загострення хронічної EBV-інфекції в стадії реплікативної активності. У 47 (48,9%) осіб виявлена латентна стадія хронічної EBV-інфекції, для якої характерна відсутність ДНК EBV («-») у біологічних середовищах [3]. Серед пацієнтів з загостренням хронічної EBV-інфекції в стадії реплікативної активності ДНК ЕБВ було виявлено: у 29 (60,4%) осіб – у зішкробах слизової задньої стінки глотки, чотирьох (8,3%) – у крові, чотирьох (8,3%) – у слині, семи (14,6%) – одночасно в крові та зішкробах слизової задньої стінки глотки, чотирьох (8,4%) – одночасно в трьох біологічних середовищах. У пацієнтів з хронічною ЕБВ-інфекцією як в стадії загострення, так і в латентній стадії найчастіше (61%) верифікувався серологічний профіль VCA-IgM/IgG<sup>+</sup>, EBNA-IgG<sup>+</sup>. За літературними даними, наявність у крові малоспецифічних антитіл ЕБВ-IgM може вказувати на тривалу (2 і більше років) персистенцію збудника [1, 6].

Оскільки нас більше цікавили пацієнти з загостренням хронічної EBV-інфекції в стадії реплікативної активності ми вибірково поділили їх на дві групи залежно від наявного серологічного профілю і провели порівняльний аналіз результатів фенотипування лімфоцитів й оцінку експресії основних активізаційних маркерів:

1 група (n=20), ДНК+, серологічний профіль VCA-IgM<sup>+</sup>/IgG<sup>+</sup>, EBNA-IgG<sup>+</sup>;

2 група (n=20), ДНК+, серологічний профіль VCA-IgM<sup>-</sup>/IgG<sup>+</sup>, EBNA-IgG<sup>+</sup>.

Результати порівнювали з показниками (середньо-статистичними) лімфограми практично здорових людей, у яких не виявлено ДНК вірусу ЕБВ (контрольна група).

У таблиці вказаний порівняльний аналіз особливостей показників лімфограми та активізаційних маркерів лімфоцитів у пацієнтів з хронічною ЕБВ-інфекцією в стадії реплікативної активності з виявленим серологічним профілем VCA-IgM<sup>+</sup>/IgG<sup>+</sup>, EBNA-IgG<sup>+</sup>, серологічним профілем VCA-IgM<sup>-</sup>/IgG<sup>+</sup>, EBNA-IgG<sup>+</sup> і здоровими особами.

**Показники лімфограми та активізаційних маркерів лімфоцитів у пацієнтів з хронічною ЕБВ-інфекцією в стадії реплікації (M ± m)**

Показники	Здорові	1 група	2 група
Lymphs (CD45+), Г/л	2,10±0,06	2,55±0,24*	1,93±0,11#
CD3+, %	70,80±1,7	77,90±1,1*	68,50±1,3#
CD3+, Г/л	1,52±0,06	1,99±0,19*	1,33±0,09*#
CD8+, %	23,70±1,6	25,30±1,3	25,40±1,3
CD8+, Г/л	0,66±0,05	0,65±0,07	0,51±0,05*#
CD4+, %	37,50±1,9	52,30±1,4*	41,70±1,5*#
CD4+, Г/л	0,85±0,05	1,34±0,13*	0,79±0,04#
CD16+/56+, %	10,30±0,4	10,4±0,6*	6,20±0,3*#
CD16+/56+, Г/л	0,36±0,03	0,27±0,03*	0,15±0,02*#
CD19+, %	11,40±0,8	11,70±0,6	13,80±0,9
CD19+, Г/л	0,26±0,01	0,31±0,04	0,27±0,03
IRI Abs Cnt	2,20±0,2	2,20±0,2	1,80±0,2
CD3+/CDHLA-DR+, %	10,70±1,9	7,10±0,7*	5,90±0,6*
CD3-/CDHLA-DR+, %	20,30±1,1	15,40±0,6*	13,10±1,1*#
CD4+/CD25+, %	14,60±1,6	20,20±0,9*	17,50±1,0*#

**Примітка:** \* – вірогідність відмінності у порівнянні з контрольною групою (p < 0,05); # – вірогідність відмінності у порівнянні з 1 групою (p < 0,05).

Як видно з **таблиці**, у пацієнтів 1-ї групи встановлено вірогідне підвищення абсолютної кількості лімфоцитів (CD45+) за рахунок підвищення відносної та абсолютної кількості Т-лімфоцитів (CD3+), Т-хелперів (CD4+) і Т-регуляторних лімфоцитів (CD4+/CD25+) (p<0,05) на тлі зниження NK-клітин (CD16+/56+), функціонально активних В-лімфоцитів (CD3-/CDHLA-DR+) й експресії активізаційних антигенів CD3+/CDHLA-DR+ (p<0,05) порівняно зі здоровими особами. Цей факт можна пояснити тим, що хронічна ЕБВ-інфекція характеризується тривалим перебігом із персистенцією збудника і формуванням дефектної імунної відповіді. Під час активного розмноження ЕБВ продукує інтерлейкін-10-подібний білок й індукує підвищення вмісту Т-регуляторних клітин, які секретують інтерлейкін 10 (ІЛ10) і трансформуючий фактор росту β (TGF-β) з потужними імуносупресивними ефектами [12]. Таке двостороння продукція супресивних факторів призводить до порушення функціонування натуральних кілерів й активних В-лімфоцитів, які належать до ефекторної ланки імунної відповіді як клітини з природною кілерною активністю.

У пацієнтів 2-ї групи особливості змін показників лімфограми та активізаційних маркерів мали більше виражений характер. А саме, визначено вірогідне зменшення абсолютної кількості лімфоцитів (CD45+) (p<0,05) порівняно з 1-ю групою пацієнтів. Ця особливість є прогностично несприятливою і може сигналізувати про формування або загострення вторинних імунodefіцитних порушень

**Таблиця** [1]. Підтвердженням настороги були й зміни решти показників. А саме, у пацієнтів 2-ї групи порівняно як з особами 1-ї групи, так і зі здоровими спостерігалось вірогідне зменшення відносних й абсолютних показників Т-лімфоцитів (CD3+), Т-цитотоксичних лімфоцитів (CD8+), Т-хелперів (CD4+), NK-клітин (CD16+/56+), активних В-лімфоцитів (CD3-/CDHLA-DR+), на тлі збільшення Т-регуляторних лімфоцитів (CD4+/CD25+) (p<0,05). Також виявлено зменшення експресії активізаційних маркерів (CD3+/CDHLA-DR+) порівняно зі здоровими особами (p<0,05). Визначена тенденція до зменшення імунологічного регуляторного індексу (IRI), що підтверджує ризик формування вторинних імунodefіцитів за Т-лімфоцитарним типом [11].

На підставі детального аналізу анамнестичних даних встановлено, що хронічна ЕБВ-інфекція в стадії реактивації асоціювала у пацієнтів з наступними клінічними проявами: швидкою втомлюваністю – у 34 (71%) осіб, загальною слабкістю – у 31 (64,5%), рецидивуючими хронічними тонзилітами (загострення більше двох разів/рік) – у 27 (56%), болями у голові та запамороченням – в 11 (23%), частими

ГРВІ (6 і більше разів/рік) – 10 (21%), тривалою субфебрильною температурою – у 9 (19%), лімфаденопатією (збільшенням частіше передньошийних і підчелепних лімфатичних вузлів) – у 9 (19%), характерними змінами поверхні язика («географічний язик») – у 9 (19%), висипом на шкірі зі свербіжем – у 3 (6%), фурункульозом, піодермією – у 3 (6%) осіб.

Скарги, анамнестичні дані та результати клінічного огляду були однаковою мірою виражені як у чоловіків, так і в жінок. Виняток становили висипи на шкірі зі свербіжем, що були зареєстровані лише в жінок. Окрім цього, лише у пацієнтів 2-ї групи на тлі вказаних вище скарг і клінічних проявів спостерігались: погіршення пам'яті, відчуття холоду та затерпання пальців рук і ніг – у трьох осіб (10,5%), артралгії – у трьох (10,5%), болі у м'язах – у двох (7%) осіб. Слід зауважити, що саме в даних осіб – у трьох ДНК ЕБВ виявили одночасно в крові та зішкробах слизової задньої стінки глотки, а в двох – відразу з трьох біологічних середовищ (кров, слина, зішкроби слизової задньої стінки глотки).

Таким чином, у пацієнтів з хронічною ЕБВ-інфекцією в стадії реплікативної активності були виражені ознаки вторинних імунodefіцитних порушень, що підтверджувалось даними показників лімфограми та активізаційних маркерів лімфоцитів. Як клінічні, так і спеціальні лабораторні показники більшою мірою проявлялись у пацієнтів з виявленим серологічним профілем VCA-IgM<sup>+</sup>/IgG<sup>+</sup>, EBNA-IgG<sup>+</sup>. Ці пацієнти потребують проведення додаткових обстежень.

### Висновки.

1. За даними молекулярно-генетичної діагностики серед обстежених пацієнтів з хронічною формою ЕБВ-інфекції у 48 (51,7%) осіб виявлена стадія реплікативної активності.

2. У пацієнтів з хронічною ЕБВ-інфекцією як у латентній, так і в стадії реплікації найчастіше (61%) верифікувався серологічний профіль VCA-IgM<sup>+</sup>/IgG<sup>+</sup>, EBNA-IgG<sup>+</sup>.

3. Особливості показників лімфограми та активізаційних маркерів лімфоцитів у пацієнтів з серологічним профілем VCA-IgM<sup>+</sup>/IgG<sup>+</sup>, EBNA-IgG<sup>+</sup> і VCA-IgM<sup>-</sup>/IgG<sup>+</sup>, EBNA-IgG<sup>+</sup> вказували на зниження противірусної активності імунної системи.

4. У пацієнтів з хронічною ЕБВ-інфекцією в стадії реплікації (серологічний профіль VCA-IgM<sup>-</sup>/

IgG<sup>+</sup>, EBNA-IgG<sup>+</sup>) зміни показників лімфограми, активізаційних маркерів й особливості клінічних проявів були більше вираженими порівняно з особами з серологічними профілем VCA-IgM<sup>+</sup>/IgG<sup>+</sup>, EBNA-IgG<sup>+</sup> і вказували на формування або загострення вторинних імунодефіцитів. Ці пацієнти потребують проведення додаткових обстежень.

**Перспективи подальших досліджень.** У перспективі планується дослідження TLR-3, 7, 9, оскільки TLR-залежна активація важлива для проліферації та дозрівання В-лімфоцитів під час розвитку інфекційного процесу. TLR-3, 7, 9 переважно розпізнають вірусасоційовані структури – нуклеїнові кислоти, які містяться в ендосомах, де вони взаємодіють з лігандами після депротейнізації віріонів.

### Література

1. Головенко Н. Г. Ранні клініко-лабораторні критерії імунодефіцитів: інформаційний лист / Головенко Н. Г., Чоп'як В. В., Чернишова Л. І. [та ін.]; Укрмедпатентінформ. – Київ, 2004. – (Проблема «Клінічна імунологія та алергологія» №167-004).
2. Епштейна-Барр вірусна інфекція в стадії реактивації: клініко-імунологічні критерії діагностики та принципи лікування / В. В. Чоп'як, Г. О. Потьомкіна, Л. М. Білянська, І. Щепанкевич // Імунологія та алергологія: наука і практика. – 2010. – №1. – С. 129.
3. Казмирчук В. Е. Диагностика и лечение инфекции, вызванной Эпштейна-Барр вирусом (вирусом герпеса человека 4 типа): Метод. рекомендации / В. Е. Казмирчук, Д. В. Мальцев // Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія. – 2011. – № 4. – С. 69-75.
4. Крамарев С. О. Клінічні прояви Епштейн-Барр вірусної інфекції у дітей / С. О. Крамарев, О. В. Виговська // Сучасні інфекції. – 2008. – №4. – С. 63-70.
5. Маричев І. Л. Роль вірусу Епштейн-Барр у захворюваності на інфекційний мононуклеоз / І. Л. Маричев, Р. А. Сажок // Сучасні інфекції. – 2008. – №1. – С. 13-18.
6. Чоп'як В. В. Ефективність застосування Гропріназину у хворих із хронічною інфекцією, зумовленою вірусом Епштейна-Барр, у стадії реплікації вірусу / В. В. Чоп'як, Г. О. Потьомкіна // Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія. – 2011. – №4. – С. 60-68.
7. Чоп'як В. В. Лекції з клінічної імунології для практичних лікарів (цикл лекцій – частина перша) / В. В. Чоп'як, Г. О. Потьомкіна, А. М. Гаврилюк. – Львів, 2010. – 226 с.
8. Amanda L. Intracellular Toll-like Receptors / L. Amanda, B. Blasius, B. Beutler // Immunity. – 2010. – Vol. 32. – P. 309-315.
9. A study of risk factors for acquisition of Epstein-Barr virus and its subtypes / D. C. Higgins, A. J. Swendlow, K. F. Macsween [et. al.] // J. Infect. Dis. – 2009. – Vol. 195. – P. 474-482.
10. CD8+ T-cells utilize TRAIL to control influenza virus infection / E. Brincks, A. Katewa, T. Kucaba [et. al.] // Immunol. – 2008. – Vol. 181. – P. 4918-4925.
11. CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death / E. Janssen, N. Droin, E. Lemmens [et. al.] // Nature. – 2005. – Vol. 434. – P. 88-95.
12. Dirons R. Dithiocarbamates and viral IL-10 collaborate in the immortalization and evasion of immune response in EBV-infected human B lymphocytes / R. Dirons, A. Tuan Le // Chem. Biol. Interact. – 2008. – Vol. 172, №1. – P. 81-92.
13. Kawa K. Epstein-Barr virus-associated diseases in humans / K. Kawa // Inf. J. Hematol. – 2000. – Vol. 71. – P. 108-117.
14. Kimberley J. Epstein-Barr virus DNA as a biomarker for Epstein-Barr virus-positive lymphomas: are we there yet? / J. Kimberley, Maher K. Gandhi den Kemia // Lymphoma. – 2009. – Vol. 50. – P. 684-686.
15. Margret L. G. Using Epstein-Barr viral load assays to diagnose, monitor, and prevent posttransplant lymphoproliferative disorder / L. G. Margret, Tang Weihua // Clin. Microbiol. rev. – 2010. – Vol. 34. – P. 350-356.
16. Multiple Epstein-Barr virus infections in healthy individuals / D. Walling, A. Brown, W. Etienne [et. al.] // J. Virol. – 2008. – Vol. 77, №11. – P. 6546-6550.
17. Performance characteristics of two real-time PCR assays for quantification of Epstein-Barr virus DNA / C. Hill, S. Harris, E. Culler [et. al.] // Am. J. Clin. Pathol. – 2009. – Vol. 125. – P. 665-671.
18. Shiels M. S. Recent trends and future directions in human immunodeficiency virus-associated cancer / M. S. Shiels, J. J. Goedert, E. A. Engels // Cancer. – 2010. – Vol. 116. – P. 5344-5347.
19. Takashi N. Foxp3 and Aire in thymus-generated T-reg cells: a link in self-tolerance / N. Takashi, S. Sakaguchi // Nature Immunology. – 2009. – Vol. 299. – P. 333-334.
20. Tosato G. Generation of Epstein-Barr Virus (EBV) – immortalized B cell lines / G. Tosato, J. I. C. Cohen // J. Exp. Med. – 2009. – Vol. 188. – P. 7-22.
21. Weinstock D. Epstein-Barr virus, Lymphoma risk and the potential role of HIV infection in IBD patients undergoing immunosuppression / D. M. Weinstock // Dig Dis. – 2010. – Vol. 28. – P. 519-524.

УДК 616. 155. 32:[616. 988:578. 825]-036. 7

**ФЕНОТИПУВАННЯ ЛІМФОЦИТІВ ТА ЇХ АКТИВІЗАЦІЙНИХ МАРКЕРІВ У ПАЦІЄНТІВ З ХРОНІЧНОЮ ЕПШТЕЙНА-БАРР ВІРУСНОЮ ІНФЕКЦІЄЮ В СТАДІЇ РЕПЛІКАТИВНОЇ АКТИВНОСТІ**

**Зубченко С. О.**

**Резюме.** Проведено комплексні клінічні та специфічні імунологічні обстеження 95 пацієнтів з хронічною Епштейна-Барр вірусною інфекцією з метою оцінки стану лімфоцитарної ланки набутого та природженого імунітету, а також визначення активності «ранніх» і «пізніх» активізаційних маркерів цих клітин. За даними молекулярно-генетичної діагностики серед обстежених пацієнтів з хронічною формою ЕБВ-інфекції у 48 (51,7%) осіб виявлена стадія реплікативної активності. Визначено, що в осіб з хронічною ЕБВ-інфекцією як у латентній, так і в стадії реплікації найчастіше (61%) верифікувався серологічний профіль VCA-IgM<sup>-</sup>/IgG<sup>+</sup>, EBNA-IgG<sup>+</sup>. Особливості показників лімфограми та активізаційних маркерів лімфоцитів у пацієнтів з серологічним профілем VCA-IgM<sup>+</sup>/IgG<sup>+</sup>, EBNA-IgG<sup>+</sup> і VCA-IgM<sup>-</sup>/IgG<sup>+</sup>, EBNA-IgG<sup>+</sup> вказували на зниження протівірусної активності імунної системи. Виявлено, що ці зміни були більше вираженими в осіб з серологічними профілем VCA-IgM<sup>-</sup>/IgG<sup>+</sup>, EBNA-IgG<sup>+</sup> і вказували на формування вторинних імунодефіцитів.

**Ключові слова:** хронічна Епштейна-Барр вірусна інфекція, імунна система, серологічний профіль, лімфоцити, активізаційні маркери.

УДК 616. 155. 32:[616. 988:578. 825]-036. 7

**ФЕНОТИПИРОВАНИЕ ЛИМФОЦИТОВ И ИХ АКТИВИЗИРОВАННЫХ МАРКЕРОВ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ ЭПШТЕЙНА-БАРР ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ В СТАДИИ РЕПЛИКАЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ**

**Зубченко С. А.**

**Резюме.** Проведены комплексные клинические и специфические иммунологические исследования 95 пациентов с хронической Эпштейна-Барр вирусной инфекцией с целью оценки лимфоцитарного звена приобретенного и врожденного иммунитета, а также активности «ранних» и «поздних» активированных маркеров этих клеток. На основании данных молекулярно-генетической диагностики среди пациентов с хронической формой ЭБВ-инфекции у 48 (51,7%) выявлена стадия репликационной активности. Определено, что в лиц с хронической ЭБВ-инфекцией как в латентной стадии, так и в стадии репликации чаще (61%) верифицировался серологический профиль VCA-IgM<sup>-</sup>/IgG<sup>+</sup>, EBNA-IgG<sup>+</sup>. Особенности показателей лимфограммы и активированных маркеров лимфоцитов у пациентов с серологическим профилем VCA-IgM<sup>+</sup>/IgG<sup>+</sup>, EBNA-IgG<sup>+</sup> и VCA-IgM<sup>-</sup>/IgG<sup>+</sup>, EBNA-IgG<sup>+</sup> указывали на снижение антивирусной активности иммунной системы. Выявлено, что эти изменения были более выражены у лиц с серологическим профилем VCA-IgM<sup>-</sup>/IgG<sup>+</sup>, EBNA-IgG<sup>+</sup> и указывали на формирование вторичных иммунодефицитов.

**Ключевые слова:** хроническая Эпштейна-Барр вирусная инфекция, иммунная система, серологический профиль, лимфоциты, активизированные маркеры.

UDC 616. 155. 32:[616. 988:578. 825]-036. 7

**Phenotyping of Lymphocytes and its Markers of Activation in Patients with Chronic EBV Infection in Active Stage of Replication**

**Zubchenko S. A.**

**Abstract.** In the last decade, special attention is paid to the so-called «opportunistic infections» that develop on the background of reduced activity of the immune system. Chronic persistent pathogen leads to the formation of secondary immunodeficiencies and to violations of the physiological mechanisms of the immune response. So today is a typical mistake that chronic EBV infection has no clinical significance and requires treatment only in immunocompromised people.

Changes of cellular components of innate and acquired immunity actively respond to EBV infection and provide basic immunological control of virus replication. Therefore, the aim of our work was to evaluate the state of innate immunity, as well as determination of «early» and «late» markers of activation of these cells in patients with various serological profiles of EBV infection.

Were examined 95 patients with chronic Epstein-Barr virus infection. Age of the patients was 20-26 years, 52 (54. 7%) – female and 43 (45. 3%) – male. By method of enzyme-linked immunosorbent assay was carried out comprehensive diagnostic study of serum determination of serological markers of EBV (EBV-VCA-IgM/IgG, EBV-EBNA-IgG). Molecular genetic studies of blood, saliva and mucosal scraping the posterior pharyngeal wall were performed by polymerase chain reaction. Phenotyping of lymphocytes and determine the expression of key activation markers was performed by flow cytometry.

In 48 (51. 7%) patients revealed EBV DNA («+») in biological environments that indicates about active stage of virus replication and in 47 (48. 9%) – EBV DNA («-») that indicates about latent stage of infection. Among the patients with acute exacerbation of chronic EBV infection under active replication of EBV DNA was detected: in 29 (60. 4%) patients in scraping the mucosal posterior pharyngeal wall, four (8. 3%) – in the blood, four (8. 3%) – in saliva, seven (14. 6%) – both in blood and mucosal scraping of the posterior pharyngeal wall, four (8. 4%) – both

in three biological environments. In both groups of patients in acute and latent stages of chronic EBV infection most often (61 %) was confirmed serotypes VCA-IgM-/IgG +, EBNA-IgG +.

Depending on serological profiles of patients with chronic EBV infection at the stage of replication they were divided into two groups: group 1 (n = 20), DNA + serological profile VCA-IgM + / IgG +, EBNA-IgG +; group 2 (n = 20), DNA + serological profile VCA-IgM-/IgG +, EBNA-IgG +. The results were compared with average statistical indicators of lymphogram of healthy people in which have not find EBV DNA virus.

Determined that indicators of limfohram and activation markers of lymphocyte in patients with serologic profile VCA-IgM + / IgG +, EBNA-IgG + and VCA-IgM-/IgG +, EBNA-IgG + shows a reduction of antiviral activity of the immune system.

We found that patients with chronic EBV infection under replication (serological profile VCA-IgM-/IgG +, EBNA-IgG +) change parameters of limfohram, activation markers and features of clinical manifestations were more severe compared with those patients, who had the serological profile of VCA-IgM + / IgG +, EBNA-IgG +. Namely, we defined probable decrease in the absolute number of lymphocytes (CD45 +), ( $p < 0.05$ ) compared to the 1st group of patients. Also, patients in group 2 compared with those of group 1 and healthy people observed the likely reduction in relative and absolute indicators of T-lymphocytes (CD3 +), T-cytotoxic (CD8 +), T-helper cells (CD4 +), NK-cells (CD16 + / 56 +) active B-lymphocytes (CD3-/CDHLA-DR +), amid increasing regulatory T-lymphocytes (CD4 + / CD25 +), ( $p < 0.05$ ). Also found reduced expression of activation markers (CD3 + / CDHLA-DR +) compared with healthy individuals ( $p < 0.05$ ). The tendency to decrease in immune regulatory index, confirming the formation of secondary immunodeficiency disorders by T-lymphocytic type.

Based on a detailed analysis of anamnestic data revealed that chronic EBV infection under reactivation associated in patients with the following clinical manifestations: fatigue – in 34 (71 %) patients, general weakness – in 31 (64.5 %), chronic recurrent tonsillitis – in 27 (56 %), pain in the head and dizziness – in 11 (23 %), frequent ARI-10 (21 %), prolonged low-grade fever – in 9 (19 %), lymphadenopathy (often increasing anterior cervical and submandibular lymph nodes) – in 9 (19 %), characteristic changes of the tongue («geographic tongue») – 9 (19 %), skin rash with itching – in 3 (6 %), furunculosis, pyoderma – in 3 (6 %) patients.

In addition, only in patients of group 2, against the above complaints and clinical symptoms were observed: memory loss, feeling cold and numbing fingers and toes – in three patients (10.5 %), arthralgia – three patients (10.5 %), pain in the muscles – in two patients (7 %). It should be noted that three people from this group showed both EBV DNA in blood and mucosal scraping the posterior pharyngeal wall, and two – in three biological media.

**Key words:** chronic Epstein-Barr virus infection, the immune system, serological profile, lymphocytes, activation markers.

*Рецензент – проф. Скрипник І. М.*

*Стаття надійшла 13. 11. 2013р.*