

УДК 616.523-022.6-092.19-008.64

### ІМУННІ ПОРУШЕННЯ У ПАЦІЄНТІВ З ГЕРПЕТИЧНОЮ ІНФЕКЦІЄЮ РОТОГЛОТКИ ТА ЇХ КОРЕКЦІЯ

\*Макаревич В.А., \*\*Коляда Т.І., \*\*Тупотілов О.В.,  
\*\*\*Коляда О.М.

\*Державний заклад «Луганський  
державний медичний університет»  
\*\*Державна Установа «Інститут  
мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова  
Національної академії медичних наук України»  
\*\*\* Харківський національний медичний  
університет

Досліджено 86 хворих на рецидивну герпетичну інфекцію ротоглотки з помірною та високою частотою рецидивів.

Показано, що ступінь виразності імунодефіцитних порушень в умовах герпетичної інфекції залежала від частоти рецидивів захворювання протягом року. У пацієнтів з високою частотою рецидивів були виявлені лейкопенія, лімфоцитоз, зниження відносного вмісту CD3+ та CD4+ лімфоцитів, виснаження пулу цитотоксичних клітин, пригнічення фагоцитарної активності, зниження метаболічного резерву, а також порушення інтерферогенезу, що потребує залучення імунокорекції до терапевтичних заходів. Визначено, що вибір імуномодуючих засобів для імунотерапії рецидивної герпетичної інфекції ротоглотки потребує проведення обов'язкового імунологічного дослідження для уточнення типу патогенетичних порушень. У пацієнтів з помірною частотою рецидивів захворювання антиген ВПГ стимулює збільшення продукції переважно Th1 цитокінів, модулюючи імунну відповідь за відповідним типом, що сприяє полегшенню імунологічного стану пацієнтів. Напроти, у хворих з високою частотою рецидивів захворювання стимуляція антигеном ВПГ може викликати посилення поляризації відповіді в напрямку Th2, що може привести до ускладнень. Імунокорекція з використанням ІФН- $\alpha$  здатна збільшувати продукцію ІЛ-1 $\beta$ , причому у пацієнтів з високою частотою рецидивів відзначалось збільшення співвідношення ІЛ-1 $\beta$ /ІЛ-1РА та зростання індукованої продукції ІЛ-10. У хворих з високою частотою рецидивів, використання ІФН- $\alpha$  для профілактики рецидивів є патогенетично обґрунтованим.

**Ключові слова:** рецидивна герпетична інфекція, імунодефіцит, інтерферони, цитокіни, цитотоксичні лімфоцити, імунокорекція

До теперішнього часу накопичений значний обсяг даних щодо патогенезу герпетичної інфекції [1]. Значна увага приділяється діагностиці та прогнозуванню перебігу захворювання, патогенетичному обґрунтуванню терапевтичної стратегії і тактики, в тому числі імунокорекції [2].

Разом з тим, основним вектором сучасних досліджень герпетичної інфекції є вивчення первинного герпесу і патогенетичних механізмів розвитку гострої герпетичної інфекції [3, 4]. Однак імунологічні механізми реактивації герпетичної інфекції, що лежать в основі рецидивування захворювання, потребують подальшого вивчення [5, 6].

Рецидивна герпетична інфекція (РГІ) з маніфестацією на слизових оболонках ротоглотки є одним з найбільш поширених видів герпетичної інфекції, спричиненої вірусом простого герпесу типу [7]. Локалізація інфекційного процесу в ротоглотці, що є характерною для герпетичного гінгівостоматиту і фаринготонзиліту, призводить до значного зниження якості життя хворих і вимагає тривалих за часом комплексних терапевтичних заходів, як для лікування загострення, так і для профілактики рецидивів [8].

Призначення імуномодуляторів у складі комплексної терапії є найбільш складним питанням в терапії РГІ. Цьому сприяє недосконалість сучасних підходів до методології призначення імунокорегуючої терапії, яка часто призначається емпірично [9]. Емпіричне призначення провокується відсутністю імунодіагностичного комплексу, що дозволяє оцінювати варіабельність чутливості пацієнта до цих препаратів в динаміці клінічного процесу, передбачати індивідуальний підхід до призначення імуномодуляторів, оцінювати індивідуальний характер вираженості вторинного імунодефіциту і його динаміку на тлі призначеної імунокорегуючої терапії [2, 10].

Зроблені в останні роки спроби структурувати імунологічні порушення у пацієнтів з РГІ будуються переважно навколо особливостей цитокінового профілю, зокрема співвідношення Th-1 і Th-2 цитокінів, порушень інтерферогенезу і цитокінін-рецепторної взаємодії [11, 12].

При цьому частина досліджень пропонує феноменологічний підхід до вибору імуотропних препаратів, заснований на виявленні індивідуальної чутливості лейкоцитів пацієнтів до того чи іншого препарату, наприклад рекомбінантного ІФН- $\alpha$  або його індукторів. Такий підхід передбачає визначення цитокінового та інтерферонового статусу в динаміці [12, 13], розрахунок індексу патогенетичного типу герпетичної інфекції, до якого входять показники індукованого синтезу ІЛ-4 та ІЛ-6, а також значення співвідношення CD4/CD8 [14], вивчення кількості клітин-мішеней імунної системи і їх функціонального резерву [15]. В інших роботах зроблена спроба оцінити також функціональний стан точок прикладання регуляторних факторів - стан системи НК-клітин і інтерферонів [16] Отримані результати свідчать про те, що поглиблене розуміння патогенетичних механізмів розвитку РГІ неможливо без вивчення особливостей клітинної кооперації імунокомпетентних клітин.

Формування противірусного імунітету є результатом складної багатостадійного процесу, в який залучені різні типи імунокомпетентних клітин, що поетапно залучаються до реалізації противірусної

відповіді зі зміною своїх функціональних властивостей і локалізації в організмі [17]. Оцінити участь окремих елементів цього складного процесу у відповідь на дію як власне інфекційного агента, так і імуномодуляторів, в умовах досліджень в природних умовах не представляється можливим [17]. У зв'язку з цим найбільш раціональним є підхід, при якому аналіз дії імуномодуляторів та ВПГ проводиться шляхом моделювання окремих етапів імунної реакції та елементів міжклітинної кооперації в умовах *in vitro*. Даний підхід дозволяє не тільки виявити порушення конкретних ланок імунітету, а й механізми дізрегуляції між імунокомпетентними клітинами, які є ключовими учасниками протівірусного імунітету.

Метою дослідження було на підставі визначення особливостей порушень імунітету в пацієнтів з помірно й високою частотою рецидивів захворювання надати обґрунтування підходів до терапії імуних порушень та своєчасної профілактики рецидивів.

### Матеріал і методи

У дослідженні взяли участь 86 пацієнтів у віці від 18 до 49 років з верифікованим діагнозом «герпетичний гінгівостоматит та фаринготонзиліт» з маніфестацією в порожнині рота та «герпетичний везикулярний дерматит» з назолабіальною маніфестацією, наявністю рецидиву герпетичної інфекції протягом останнього місяця, а також імуної недостатності. Пацієнти перебували на стаціонарному лікуванні на базі КЗОЗ «Харківська міська клінічна лікарня швидкої та невідкладної медичної допомоги ім. проф. О.І. Мещанінова». Верифікація діагнозу здійснювалася на підставі клінічної картини РГІ, даних анамнезу, лабораторних критеріїв (ПЛР на ВПГ-1/2, серологічна діагностика - виявлення антитіл IgM-HSV-1/2, IgG-HSV-1/2). Контрольну групу склали 19 практично здорових людей у віці від 21 до 47 років. Критеріями включення в контрольну групу були: відсутність симптомів і маніфестації герпетичної інфекції протягом як мінімум останнього року; відсутність гострих інфекцій протягом як мінімум 1 місяця до моменту взяття крові; відсутність хронічних запальних і аутоімуних захворювань. Додатково у даної групи осіб контролювався рівень IgM-HSV-1/2, IgG-HSV-1/2 у сироватці крові для виключення прихованого безсимптомного перебігу хронічної герпетичної інфекції. Всі пацієнти і здорові донори, що прийняли участь у дослідженні дали добровільну письмову згоду на участь в дослідженні. Хворі з РГІ були розділені на дві групи: група I - пацієнти з помірною частотою рецидивів <4 разів на рік (n = 51); група II - пацієнти з високою частотою рецидивів  $\geq 4$  раз на рік (n = 35).

Виділення моноклеарних клітин (МНК) проводили на градієнті щільності ( $\rho=1,077$  г/см<sup>3</sup>), доводили до концентрації  $5 \times 10^6$  кл./мл та розподіляли по паралельних пробах (серіях) для подальшої обробки й постановки імунологічних тестів [18]. Виділення моноцитарної фракції проводили шляхом відбору адгезованих клітин через 2 години інкубації МНК, які

у подальшому інкубувалися в трьох паралельних серіях: без додавання індуктора; з додаванням інактивованої герпетичної вакцини «Вітагерпепак», (Росія) у концентрації  $10^7$  віріонів/мл; а також з додаванням рекомбінантного ІФН- $\alpha 2b$  людини у концентрації 10 од/мл. Лімфоцити інкубували 24 години в аналогічних умовах без додавання індуктора з подальшим поділом на чотири серії.

Визначення субпопуляцій лімфоцитів виконували методом люмінесцентної мікроскопії з використанням FITC-мічених моноклональних антитіл проти поверхневих антигенів CD3, CD4, CD8, CD16, CD22, виробництва компанії «Медбіоспектр» (Москва, Росія) [18]. Оцінку функціональної реактивності лімфоцитів здійснювали методом постановки РБТЛ із ФГА в концентрації 5 мкг/мл, облік реакції виконували морфологічним способом. Визначення фагоцитарної активності проводили латексним методом із розрахунком показників фагоцитозу: фагоцитарного індексу (ФІ) і фагоцитарного числа (ФЧ) [18]. Для оцінки метаболічного потенціалу фагоцитів використовували НСТ-тест [18]. Визначення ЦІК у сироватці крові проводили методом селективної преципітації комплексів антигенів 3,5%-ім розчином ПЕГ (м.м. 6000) виробництва Applichem GmbH (Німеччина) [30]. Комплементарну активність сироватки крові визначали фотометрично по 50% гемолізу (CH<sub>50</sub>/мл) [18]. Вміст цитокінів визначали в супернатантах після 24 годин культивування МНК (ІФН- $\alpha$ , ІФН- $\gamma$ ) та моноцитарної фракції МНК (ФНП- $\alpha$ , ІЛ-1 $\beta$ , ІЛ-1РА, ІЛ-10, ІЛ-12p40/70) імуоферментним методом з використанням тест-систем виробництва ЗАТ «Вектор-Бест» (Росія), eBioscience (США) та ІФА аналізатора Stat-Fax 303 (США) згідно з інструкціями виробника. Для оцінки здатності клітин моноцитарної фракції змінювати цитотоксичні властивості аутологічних лімфоцитів, клітини двох серій моноцитарної фракції (не стимульовані моноцити та ВПГ-стимульовані) та двох серій лімфоцитарної фракції інкубували спільно у співвідношенні стимулюючих і відповідують клітин 10:1. Для порівняльної оцінки прямої стимулюючої дії ІФН- $\alpha$  на цитотоксичний потенціал ефекторних клітин третю серію лімфоцитів інкубували з додаванням рекомбінантного ІФН- $\alpha 2b$  людини в концентрації 10 од/мл. Четверта серія лімфоцитів інкубувалася без додавання індуктора. Через 24 години оцінювали вміст перфорин-позитивних (Pr<sup>+</sup>) цитотоксичних CD8<sup>+</sup> лімфоцитів і натуральних кілерів за кількістю клітин з внутрішньоклітинним вмістом перфоруна методом імуофенотипування. Для цього лімфоцити пермеабілізували розчином Permeab (Becton Dickinson, США), інкубували 30 хвилин з PE-міченими моноклональними антитілами до перфоруна (Becton Dickinson, США) при t=18-20°C, відмивали, готували мазки і підраховували кількість цитотоксичних клітин з внутрішньоклітинним вмістом перфоруна в полі зору люмінесцентного мікроскопа [19, 20]. Індекс впливу розраховували як співвідношення кількості Pr<sup>+</sup> клітин в серії до кількості цих клітин серед лімфоцитів,

інкубованих без клітин МФМ [20]. При обробці даних використовували непараметричні методи (U-критерій Манна-Уїтні, коефіцієнт кореляції Спірман) [21].

#### Результати та обговорення

Одним з основних проявів імунодефіциту в умовах герпетичної інфекції є підвищена частота рецидивів захворювання протягом року і резистентність до етіотропної терапії з використанням

ациклических нуклеозидів [2, 22]. Для визначення патогенетичного типу імунних порушень було проведено імунологічне обстеження пацієнтів, яке містило в собі оцінку показників системного імунітету, а також дослідження особливостей інтерферогенезу (in vitro) у хворих із РГІ (табл. 1).

**Таблиця 1 - Порівняльна характеристика показників імунітету у пацієнтів з помірною та високою частотою рецидивів герпетичної інфекції (M ± m)**

Показники	Од. вим.	Група I (n=51)	Група II (n=35)	Контроль (n=19)
Лейкоцити	кл.х10 <sup>9</sup> /л	5,7±0,6 <sup>2)</sup>	4,1±0,7 <sup>1,2)</sup>	6,5±0,4
Лімфоцити	%	32,5±2,4 <sup>2)</sup>	45,2±1,8 <sup>1,2)</sup>	28,4±2,1
	кл.х10 <sup>6</sup> /л	1,9±0,1	1,9±0,1	1,8±0,1
CD3+	%	55,3±4,2	52,4±4,8	56,0±2,1
	кл.х10 <sup>6</sup> /л	1051±80	996±91	1008±38
CD4+	%	44,2±3,4 <sup>2)</sup>	24,2±5,3 <sup>1,2)</sup>	41,3±2,6
	кл.х10 <sup>6</sup> /л	465±36 <sup>2)</sup>	241±51 <sup>1,2)</sup>	416±29
CD8+	%	31,4±2,6 <sup>2)</sup>	20,8±2,9 <sup>1,2)</sup>	28,5±1,8
	кл.х10 <sup>6</sup> /л	330±27 <sup>2)</sup>	207±26 <sup>1,2)</sup>	287±22
NK-клітини (CD16+)	%	28,2±6,8 <sup>2)</sup>	11,9±1,3 <sup>1,2)</sup>	18,3±4,1
	кл.х10 <sup>6</sup> /л	536±129 <sup>2)</sup>	226±25 <sup>1,2)</sup>	310±74
В-лімфоцити (CD22+)	%	23,1±4,6 <sup>2)</sup>	15,2±2,5 <sup>2)</sup>	18,7±2,1
	кл.х10 <sup>6</sup> /л	439±87 <sup>2)</sup>	289±48 <sup>2)</sup>	337±38
РБТЛ спонт.	%	8,4±0,6 <sup>2)</sup>	11,4±0,8 <sup>1,2)</sup>	6,5±0,9
РБТЛ ФГА	%	45,2±1,8	51,5±3,6	47,3±2,7
Індекс стим. РБТЛ	од.	5,4	4,5 <sup>1)</sup>	7,3
ЦІК	од.	0,074±0,006 <sup>1,2)</sup>	0,12±0,004 <sup>1,2)</sup>	0,031±0,006
IgA	г/л	2,6±0,04 <sup>1,2)</sup>	3,1±0,04 <sup>1,2)</sup>	1,51±0,05
IgM	г/л	1,24±0,09 <sup>2)</sup>	0,7±0,02 <sup>1,2)</sup>	1,21±0,04
IgG	г/л	14,4±0,4 <sup>2)</sup>	18,2±0,6 <sup>1,2)</sup>	12,6±0,2
НСТ (с)	од.	0,046±0,002 <sup>1,2)</sup>	0,032±0,001 <sup>1,2)</sup>	0,062±0,003
НСТ (и)	од.	0,088±0,021 <sup>2)</sup>	0,043±0,017 <sup>1,2)</sup>	0,108±0,025
Індекс стимул.	од.	1,91	1,34	1,74
ФІ	%	52,7±5,7 <sup>1,2)</sup>	28,9±3,1 <sup>1,2)</sup>	70,1±4,1
ФЧ	од.	3,8±0,2 <sup>1,2)</sup>	2,6±0,5 <sup>1,2)</sup>	7,6±0,9
Активність комплексу СН50	од.	64±7	72±4	51±6

Примітка: <sup>1)</sup> - відмінності достовірні при порівнянні з контрольною групою ( $p < 0,05$ ); <sup>2)</sup> - відмінності достовірні при порівнянні груп I та II ( $p < 0,05$ )

Ступінь виразності імунних порушень в умовах герпетичної інфекції залежала від частоти рецидивів захворювання протягом року. У пацієнтів з високою частотою рецидивів РГІ спостерігалось зниження числа лейкоцитів в 1,6 рази щодо контролю ( $p < 0,05$ ). Відносний вміст лімфоцитів у даних пацієнтів був вище, ніж у контрольній групі в 1,6 рази ( $p < 0,05$ ). Поряд зі зниженням вмісту CD4+ клітин, спостерігалось виснаження пулу цитотоксичних клітин, як CD8+ лімфоцитів, так і, більшою мірою,

натуральних кілерів. Відносний вміст CD8+ лімфоцитів був в 1,4 рази нижче контролю ( $p < 0,05$ ) та в 1,5 рази нижче аналогічного показника в пацієнтів з помірною частотою рецидивів РГІ ( $p < 0,05$ ). У пацієнтів II групи індекс стимуляції РБТЛ із ФГА складав 4,5 проти 5,4 в I групі ( $p < 0,05$  порівнянні з контрольною групою). Рівні сироваткових IgA і IgG були підвищені щодо контролю в 2,1 рази і 1,7 рази відповідно (обидва показники  $p < 0,05$  відносно контролю). Концентрація ЦІК у сироватці крові

пацієнтів обох груп перевищувала контроль: в I групі в 2,4, а в II групі - в 3,9 рази, що свідчить про недостатність елімінаційної функції ( $p < 0,05$ ).

У пацієнтів із РГП виявлене зниження активності фагоцитозу в обох групах, більш виражене в групі з високою частотою рецидивів захворювання - у II групі значення ФІ було знижено в порівнянні з I групою в 1,8 рази, з контролем - в 2,4 рази ( $p < 0,05$ ). При цьому значення ФЧ було знижено в 2,9 рази щодо контролю ( $p < 0,05$ ).

Крім того в обох групах хворих було виявлено зниження метаболічного резерву (показника стимульованого НСТ-тесту), що свідчить про порушення фагоцитарної функції. Підвищений вміст В-лімфоцитів і вірогідно збільшений рівень імуноглобулінів свідчить про активацію гуморальної ланки. Активність комплементу у хворих з РГП була достовірно вище контролю (в 1,4 рази) у групі з високою частотою рецидивів захворювання.

В групі пацієнтів з високою частотою рецидивів РГП спостерігався дефіцит ІФН- $\alpha$  у порівнянні з контролем і I групою, визначений рівень ІФН- $\alpha$  ( $11,5 \pm 1,7$  пг/мл) можна охарактеризувати як недостатній для реалізації повноцінної протівірусної відповіді,  $p < 0,05$  (рис. 1). Рівень спонтанної продукції ІФН- $\alpha$  у пацієнтів з помірною частотою рецидивів РГП ( $29,7 \pm 2,7$  пг/мл) був підвищений щодо контролю ( $18,2 \pm 1,6$  пг/мл) в 1,6 рази ( $p < 0,05$ ). Порушення в синтезі ІФН- $\alpha$  можуть бути причиною зниження активності мононуклеарних лейкоцитів і натуральних кілерів, проліферативної активності Т- і В-лімфоцитів, а також недостатності прямої протівірусної активності.

У хворих групи I відзначене незначне підвищення рівня спонтанної продукції ІФН- $\gamma$

( $46,5 \pm 3,8$  пг/мл), що в 1,3 рази перевищувало значення в контрольній групі ( $35,5 \pm 2,8$  пг/мл),  $p < 0,05$ . У пацієнтів з високою частотою рецидивів спонтанна продукція ІФН- $\gamma$  не мала достовірних відмінностей від контролю, вказуючи на гіпореактивність - порушення активації інтерференогенезу у відповідь на інфекцію.

Виявлені порушення клітинної та гуморальної ланки імунітету у пацієнтів з РГП потребують залучення імунокорекції до терапевтичних заходів. Саме імунологічні порушення, зокрема наявність імунодефіцитів, розглядаються як один з основних чинників частого рецидивування герпетичної інфекції ротоглотки [4, 22]. У той самий час обґрунтований вибір імуномодулюючих препаратів та адекватної індивідуалізованої схеми імунокорекції потребує урахування патогенетичних механізмів розвитку герпетичної інфекції та визначення найбільш важливих мішеней для проведення імуноотропної терапії в залежності від виявлених порушень. Сучасні уявлення щодо імунопатогенезу рецидивної герпетичної інфекції надають найбільшу роль порушенням цитотоксичної функції ефektorних лімфоцитів, фагоцитозу, порушенням інтерференогенезу та цитокіноспосередкованої клітинної кооперації [1, 2, 5].

Дослідження впливу ВПГ-вакцини на продукцію інтерферонів визначило, що у пацієнтів з помірною частотою рецидивів ВПГ-стимульована продукція ІФН- $\alpha$  підвищувалася в 3 рази відносно рівню спонтанної продукції ( $p < 0,05$ ) та не мала достовірних відмінностей від контролю, а у пацієнтів з високою частотою рецидивів - в 2,3 рази,  $p < 0,05$  (рис. 1).

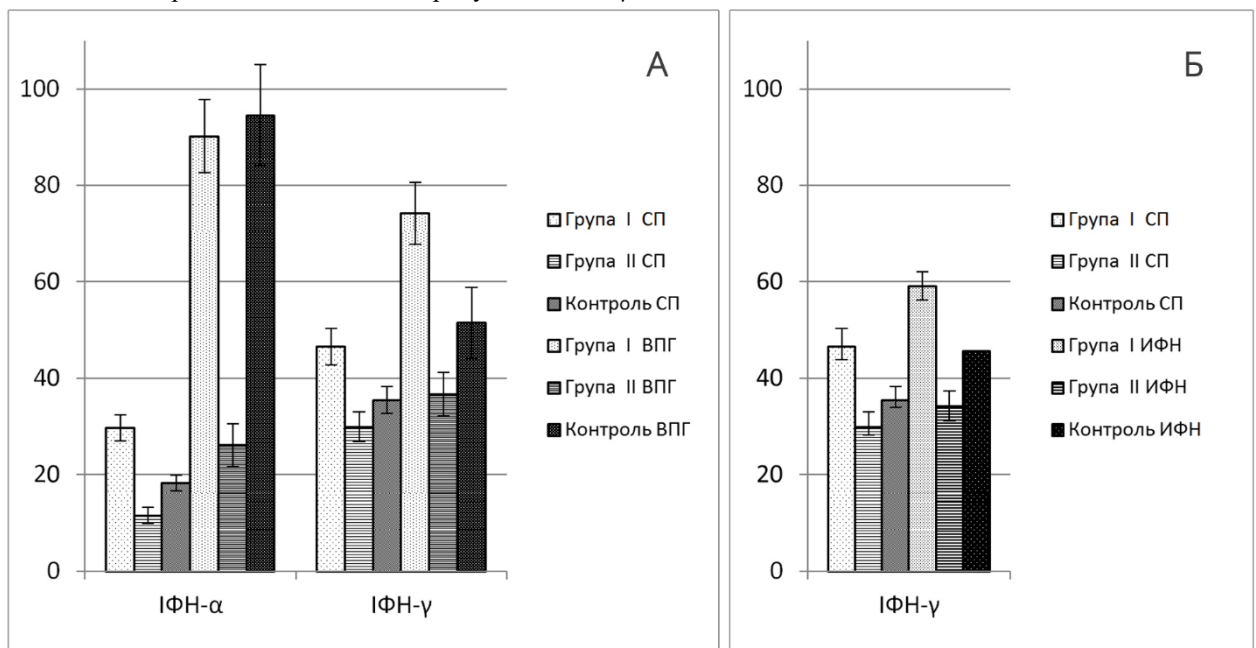


Рисунок 1. Продукція інтерферонів МНК, спонтанна (СП) та стимульована и антигеном ВПГ (А) та ІФН- $\alpha$  (Б), пг/мл

Рівень індукованої антигеном ВПГ продукції ІФН- $\gamma$  у пацієнтів з високою частотою рецидивів був

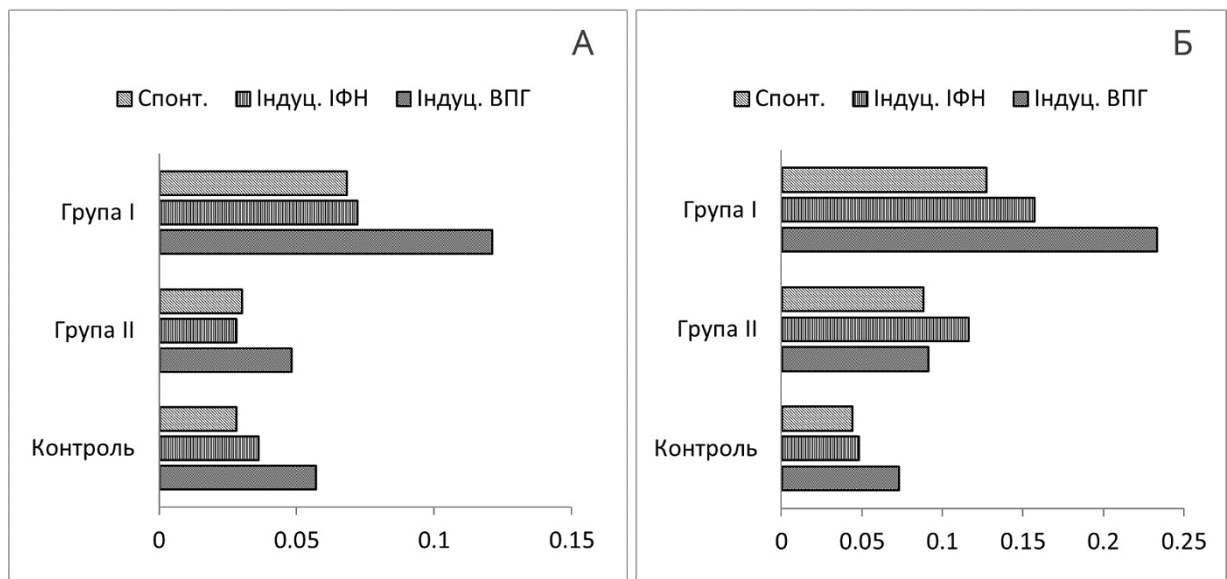
мінімальним і становив  $36,7 \pm 4,5$  пг/мл (індекс стимуляції дорівнював 1,2). У хворих з помірною частотою рецидивів вміст ВПГ-індукованого ІФН- $\gamma$

становив  $74,2 \pm 6,4$  пг/мл та був вище показнику у контрольній групі ( $51,5 \pm 7,3$  пг/мл) в 1,4 рази (індекс стимуляції – 1,6). Таким чином резервна здатність синтезувати ІФН- $\gamma$  у групах пацієнтів з помірною частотою рецидивів РГІ перебувала на рівні показника практично здорових донорів, у той час як у пацієнтів з високою частотою рецидивів спостерігалось виражене зниження стимулюючої дії антигену ВПГ.

Інкубація мононуклеарів з додаванням ІФН- $\alpha$  викликала достовірне збільшення продукції ІФН- $\gamma$  у пацієнтів з помірною частотою рецидивів РГІ ( $59,1 \pm 2,9$  пг/мл) та в контрольній групі ( $45,7 \pm 3,5$  пг/мл), індекс стимуляції склав 1,3. У пацієнтів з високою частотою рецидивів рівень інтерферон-індукованого

ІФН- $\gamma$  ( $34,7 \pm 3,1$  пг/мл) не мав достовірних відмінностей від рівня спонтанної продукції ( $29,9 \pm 3,1$  пг/мл).

Визначено, що висока частота рецидивів герпетичної інфекції супроводжується зниженням рівня ФНП- $\alpha$ , підвищенням спонтанної та індукованої продукції ІЛ-10 (у 76% хворих), а також ІЛ-12 та ІЛ-1 $\beta$  клітинами моноцитарної фракції мононуклеарів периферичної крові (в 85% випадків). При цьому у 67% пацієнтів з високою частотою рецидивів захворювання було виявлено дисбаланс продукції ІЛ-12p70/ІЛ-12p40 (рис. 2), а у 43% - підвищена продукція рецепторного антагоніста ІЛ-1 (ІЛ-1РА).



**Рисунок 2. Співвідношення продукції ІЛ-12p70/ІЛ-12p40 (А) та ІЛ-1 $\beta$ /ІЛ-1РА (Б) клітинами моноцитарної фракції МНК - спонтанної та стимульованої антигеном ВПГ та ІФН- $\alpha$**

Спонтанна продукція ФНП- $\alpha$  клітинами моноцитарної фракції МНК у пацієнтів з високою частотою рецидивів ( $63,7 \pm 5,3$  пг/мл) була в 1,4 нижче показника в контрольній групі, що може розглядатися як фактор, що перешкоджає формуванню повноцінної імунної відповіді при герпетичній інфекції ( $p < 0,05$ ). З іншого боку, зниження продукції ФНП- $\alpha$  в умовах частих рецидивів захворювання може виступати в якості адаптивної реакції імунної системи, спрямованої на запобігання реалізації проапоптотичного потенціалу клітин і розвитку необоротного ушкодження тканин, обумовленого дією самого вірусного агенту. При стимуляції антигеном ВПГ продукція ФНП- $\alpha$  в II групі зростала до  $207,8 \pm 69,6$  пг/мл.

Рівень продукції ІЛ-1 $\beta$  не стимульованими клітинами моноцитарної фракції МНК в I групі ( $130,2 \pm 14,8$  пг/мл) був підвищений щодо контролю ( $187,7 \pm 14,1$  пг/мл) в 2,4 рази, в II групі ( $196,5 \pm 31,7$  пг/мл) - в 3,6 рази (обидва показники  $p < 0,05$ ). Збільшення продукції ІЛ-1 $\beta$  у відповідь на стимуляцію ВПГ спостерігалось у всіх пацієнтів із РГІ: індекс стимуляції ІЛ-1 $\beta$  в I та II групі становив 2,0 та 1,7, а в контрольній групі - 3,5 (всі показники  $p < 0,05$ ). При цьому стимуляція ІФН- $\alpha$  у контрольній групі не

приводила до достовірного збільшення продукції ІЛ-1 $\beta$ , а в пацієнтів обох груп із РГІ індуція збільшувала рівень ІЛ-1 $\beta$ . У пацієнтів з високою частотою рецидивів спостерігалось значне збільшення рівня спонтанної продукції ІЛ-1РА ( $2246,1 \pm 161,5$  пг/мл) відносно контролю ( $1237,2 \pm 112,4$  пг/мл), при чому стимуляція антигеном ВПГ приводила до збільшення індукованої продукції ІЛ-1РА до  $3780,9 \pm 181,6$  пг/мл та  $2576,7 \pm 137,1$  пг/мл відповідно. Регуляторна дія ІФН- $\alpha$  проявлялася у збільшенні продукції ІЛ-1 $\beta$ , причому у пацієнтів з високою частотою рецидивів РГІ відзначалось збільшення співвідношення ІЛ-1 $\beta$ /ІЛ-1РА з 0,088 до 0,116 ( $p < 0,05$ ). Співвідношення ІЛ-1 $\beta$ /ІЛ-1РА розглядається як важливий маркер активності запального процесу [23]

Спонтанна продукція ІЛ-10 клітинами моноцитарної фракції МНК у I групі й контролі була слідовою, а в пацієнтів з високою частотою рецидивів ( $9,3 \pm 1,1$  пг/мл) - в 6,6 рази вище за контрол ( $p < 0,05$ ). Індекс ВПГ-стимуляції продукції ІЛ-10 клітинами моноцитарної фракції МНК в I групі, а також контролі склав 1,3 і 1,5 відповідно (обидва показники  $p < 0,05$ ). Достовірне збільшення ІФН- $\alpha$ -індукованої продукції ІЛ-10 було виявлено тільки в пацієнтів з високою частотою рецидивів - в 1,4 рази ( $p < 0,05$ ).

Виявлене, що у пацієнтів із частими рецидивами РГІ рівень спонтанної продукції ІЛ-12p70 був в 1,9 рази вище контролю та складав  $51,9 \pm 2,2$  пг/мл., а продукція субодиниці ІЛ-12p40 ( $1769,8 \pm 66,7$  пг/мл) - в 3,8 рази вище рівня в I групі та в 1,8 рази вище рівня в контролі (всі показники  $p < 0,05$ ). Продукція ІЛ-12p70, індукована антигеном ВПГ, в I групі була знижена щодо контролю в 1,4 рази ( $p < 0,05$ ), а в II групі, навпаки, вище контролю в 1,2 рази ( $p > 0,05$ ). Стимуляція антигеном ВПГ вірогідно збільшувала продукцію ІЛ-12p40 у всіх пацієнтів із РГІ й здоровіших донорів. Рівні ІФН- $\alpha$ -індукованої продукції як ІЛ-12p70, так і ІЛ-12p40, не мали відмінностей від рівня спонтанної продукції у всіх групах.

Блокування ефектів ІЛ-12 та ІЛ-1 $\beta$  внаслідок конкурентного зв'язування ІЛ-12p40 та ІЛ-1РА з відповідними рецепторами, розглядається як важливий механізм порушення міжклітинної кооперації, здатний викликати зсув імунної відповіді в бік Th2, що може вести до зниження ефективності противірусного захисту і сприяти більш важкому перебігу РГІ.

У пацієнтів з високою частотою рецидивів захворювання спостерігався знижений в 2 рази відносно здорових донорів вміст перфорин-позитивних цитотоксичних лімфоцитів ( $p < 0,05$ ). Показано, що інактивована ВПГ-вакцина здатна підвищувати вміст перфорин-позитивних цитотоксичних лімфоцитів у пацієнтів з помірною та високою частотою рецидивів, при цьому найбільший індекс впливу ВПГ-антигена (2,1 проти 1,6 у пацієнтів з помірною частотою рецидивів) визначено у пацієнтів з високою частотою рецидивів захворювання, що може свідчити про більшу залученість клітин моноцитарної фракції мононуклеарів в регуляцію цитотоксичної функції ефекторних клітин (обидва показники  $p < 0,05$ ). Вплив ІФН- $\alpha$  на відносний вміст перфорин-позитивних лімфоцитів у пацієнтів з РГІ був менш виражений порівняно з ВПГ-вакциною. Так індекс стимуляції у пацієнтів з помірною частотою рецидивів був на рівні 1,4 ( $p < 0,05$ ), а у пацієнтів з високою частотою рецидивів – 1,2 ( $p > 0,05$ ). Відмінності у стимулюючій дії ІФН- $\alpha$  та ВПГ-антигена пов'язані з різними механізмами та мішенями активації цитотоксичних клітин. На відміну від ВПГ-антигену, який опосередковано, через стимуляцію антигенпрезентуючих клітин, активує більшою мірою цитотоксичні CD8+ клітини, дія ІФН- $\alpha$  при стимуляції МНК пов'язана переважно з прямою активацією натуральних килерів, механізм якої є недостатньо дослідженим. У той самий час, крім натуральних килерів, ІФН- $\alpha$  також активує Т-лімфоцити та клітини моноцитарної фракції МНК, підвищує експресію молекул МНС-I [24].

#### Висновки

1. Ступінь виразності імунних порушень в умовах герпетичної інфекції залежала від частоти рецидивів захворювання протягом року. Аналіз частоти рецидивів виявив взаємозв'язок з характером імунологічних порушень - у пацієнтів частотою

рецидивів більш 4 раз на рік імунодефіцит зустрічався в 87,5%, а в пацієнтів з помірною частотою рецидивів - в 68% випадків.

2. У групі пацієнтів з високою частотою рецидивів захворювання були виявлені лейкопенія, лімфоцитоз, зниження відносного вмісту субпопуляцій CD3+, CD4+, CD8+, CD16+ лімфоцитів та їх проліферативної спроможності при ФГА-стимуляції, зниження активності фагоцитозу та метаболічного резерву.

3. Показано, що рецидивна герпетична інфекція у хворих з помірною та високою частотою рецидивів супроводжується підвищеним рівнем IgA та IgG, на тлі недостатності елімінаційної функції, про що свідчить підвищена в 2,4 та 3,9 рази відповідно концентрація ЦІК у сироватці крові.

4. Підвищений в 1,3 рази вміст ІФН- $\gamma$  у пацієнтів з помірною частотою рецидивів можна розглядати як універсальну реакцію імунної системи, спрямовану на елімінацію вірусу, а у пацієнтів з високою частотою рецидивів захворювання знижений рівень ІФН- $\gamma$  призводить до недостатньої імуномодулюючої і антиреплікативної здатності цього противірусного цитокіну.

5. Отримані результати свідчать про те, що вибір імуномодельючих засобів для імунотерапії рецидивної герпетичної інфекції ротоглотки потребує проведення обов'язкового імунологічного дослідження. У пацієнтів з помірною частотою рецидивів захворювання антиген ВПГ стимулює збільшення продукції переважно Th1 цитокінів, модулюючи імунну відповідь за відповідним типом, що сприяє полегшенню імунологічного стану пацієнтів. Навпроти, у хворих з високою частотою рецидивів захворювання стимуляція антигеном ВПГ може викликати посилення поляризації відповіді в напрямку Th2, що може привести до ускладнень.

6. Показано, що імунокорекція з використанням ІФН- $\alpha$  здатна збільшувати продукцію ІЛ-1 $\beta$ , причому у пацієнтів з високою частотою рецидивів відзначалось збільшення співвідношення ІЛ-1 $\beta$ /ІЛ-1РА та зростання індукованої продукції ІЛ-10. Таким чином, у хворих з високою частотою рецидивів, використання ІФН- $\alpha$  для профілактики рецидивів є патогенетично обґрунтованим.

#### References

1. Isakov V.A. Human herpes virus infection: a guide for doctors [Text] // V.A. Isakov, E.I. Arkhipova, D. Isaev / - SPb.: SpetsLit, 2013. - 670 p.
2. Haldin A.A. Strategy and tactics of management of patients with herpes virus infections of the skin and mucousal tissues (standardization of treatment) [Text] // A.A. Haldin / Clinical dermatology and venereology. - 2013. - № 2. - P. 84-88.
3. Suazo P.A. Evasion of Early Antiviral Responses by Herpes Simplex Viruses [Text] // Paula A. Suazo, Francisco J. Ibañez, Angello R. Retamal-Díaz, Marysol V. Paz-Fiblas, Susan M. Bueno, Alexis M. Kalergis, Pablo A. González / Hindawi Publishing Corporation. Mediators of Inflammation. – 2015. - Vol. 2015 (2015) – 16 p.

4. Melchjorsen J., Matikainen S., Paludan S. R. Activation and evasion of innate antiviral immunity by herpes simplex virus [Text] // *Viruses*. - 2009. - Vol. 1. - № 3. - P. 737-759.
5. Khanna K.M. Immunity to latent viral infection: many skirmishes but few fatalities [Text] // K.M. Khanna, A.J. Lepisto, R.L. Hendricks / *Trends Immunol.* - 2004. - Vol. 25. - № 5. - P. 230-234.
6. Spiridonova S.A. Chronic recurrent herpetic stomatitis as a disease of the immune system [Text] // S.A. Spiridonova, S.M. Tolmacheva, L.M. Lukinyh / *Modern medical technology*. - 2012. - №3. - P. 121-125.
7. Popova O.I. Herpetic infection as the leading medical and social problem [Text] // O.I. Popova / *Modern stomatology* - 2013. - № 2. - P. 48-50.
8. Khlamova O.G. Optimizing treatment of herpetic stomatitis in patients with chronic tonsillitis [Text] // O.G. Khlamova, A.A. Shuldyakov, A.V. Lepilin / *Antibiotics and chemotherapy*. - 2011. - Vol. 56. - P. 7-8.
9. Veretennikova M.A. Modern pharmacotherapy of herpes using various dosage forms [Text] // M.A. Veretennikova. / *Fundamental research*. - 2014. - № 8. - P. 1630-1634.
10. Uyangaa E. Prophylactic and therapeutic modulation of innate and adaptive immunity against mucosal infection of herpes simplex virus [Text] // E. Uyangaa, A.M. Patil, S.K. Eo / *Immune network*. - 2014. - Vol. 14. - № 4. - P. 187-200.
11. Naslednikova I.O. The imbalance of immunoregulatory Th1- and Th2-cytokines in persistent viral infections [Text] // I.O. Naslednikova [et al.] / *Medical Immunology*. - 2007. - Vol. 9. - № 1. - P. 53-60.
12. Mezentseva M.V. Directional correction of cytokine regulatory network for viral infections [Text] // M.V. Mezentseva, R.J. Podchernyaeva, L.V. Uryvaev, V.E. Shcherbenko, V.A. Zuev / *Bulletin of the Russian Academy of Natural Sciences*. - 2011. - P. 9-13.
13. Nagoev B.S. Cytokine status in patients with herpes virus infection [Text] // B.S. Nagoev, Z. A. Kambachokova / *Infectious Diseases*. - 2011. - Vol. 11. - № 1. - P. 19-23.
14. Haldin A.A. Immunological study of the differentiated approach to the treatment of herpes simplex. Extended abstract of Doctor of Medicine dissertation [Text]. - M., 2000. - 46 p.
15. Didkovskiy N.A. Pathogenetic aspects of severe herpes infections [Text] // N.A. Didkovskiy [et al.] / *Bulletin of experimental biology and medicine*. - 2007 - № 2. - P. 76-81.
16. Karsonova A.B. The immunological disorders in the «IFN-alpha/NK-cell» system in patients with frequently recurrent herpes simplex [Text] // A.B. Karsonova, A.E. Shulzhenko, A.B. Karaulov / *Journal of microbiology, epidemiology and immunology*. - 2014. - № 3. - P. 27-34.
17. Talaev V.Y. Prospects for the use of models of immune processes in vitro to improve the means of immunization [Text] // V.Y. Talaev, M.V. Plekhanova, E.I. Efimov / *Medical Almanac* - 2011. - № 4 (17). - P. 75 - 78.
18. Kovalchuk L.V. Immunology: practicum [Text] / L.V. Kovalchuk [et al.]. - M., 2012. - 176 p.
19. Groscurth P. Killing mechanisms of cytotoxic T lymphocytes [Text] // P. Groscurth, L. Filgueira / *News Physiol. Sci.* — 1998. — Vol. 13. - № 3. — P. 156—162.
20. Borunova A.A. Perforin capacity of effector cells in cancer patients [Text] // A.A. Borunova, G.Z. Chkadua, T.N. Zabolotina, Z.G. Kadagidze / *Journal of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS*. - 2005. - № 3-4. - P. 7-9.
21. Glantz S. Biomedical statistics. Trans. from English [Text] / S. Glantz. - M., Practice, 1998. - 459 p.
22. Pukalyak R.M. Association of allelic gene polymorphism of LMP2 immunoproteosome with HSV infection severity [Text] // R.M. Pukalyak, V.V. Chopryak, S.V. Goncharov, V.E. Dosenko / *Acta Medica Leopoliensia*. - 2008. - Vol. 14. - № 1. - P. 175-178.
23. Casini-Raggi V. Mucosal imbalance of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. A novel mechanism of chronic intestinal inflammation [Text] // V. Casini-Raggi, L. Kam, Y.J. Chong, C. Flocchi, T.T. Pizarro, F. Cominelli / *J. Immunol.* - 1995. - Vol. 15. - №5. - P. 2434-2440.
24. Vollstedt S. et al. Interplay between alpha/beta and gamma interferons with B, T, and natural killer cells in the defense against herpes simplex virus type 1 [Text] // S. Vollstedt, S. Arnold, C. Schwerdel et al. / *J Virol.* - 2004. - Vol. 78. - P. 3846-3850.

UDC 616.523-022.6-092.19-008.64

**IMMUNE DISORDERS AND THEIR CORRECTION IN PATIENTS WITH HERPES INFECTION OF THE OROPHARYNX**  
**Makarevich V.A., Kolyada T.I. Tupotilov O.V. Kolyada O.M.**

Recurrent herpes infection of the oropharynx caused by herpes simplex virus type I and II occupies an important place among the infectious diseases of the oral cavity. The mechanisms which lead to the development of recurrence of the disease are studied insufficiently, and this limits the clinical possibilities of prophylactics. The frequency of the manifestations of herpetic infection and their intensity depend on the state of the immune system, in particular, the nature and level of pathogenic disorders of immune response. The immunotherapy requires a personalized approach taking into account the variability of "sensitivity" of immune index of the patient for potential therapeutic effects. The aim of the study was to justify the treatment of immune disorders and timely prevention of recurrence, and also complications that occur when infection activates during the long-term viral persistence, based on definition of the characteristics of immune disorders in patients with moderate and high recurrence rate of the disease. **Materials and methods.** The study involved 86 patients aged 18 to 49 years with herpesviral gingivostomatitis and pharyngotonsillitis and herpetic vesicular dermatitis. The control group consisted of 19 healthy people of comparable age. Patients with recurrent HSV infection were divided into two groups. Group I was formed of patients with moderate rates of relapse less than

4 times per year ( $n = 51$ ), and group II represented patients with high rates of relapse not less than 4 times a year ( $n=35$ ). Lymphocyte subsets were defined by fluorescent microscopy method using FITC-labeled monoclonal antibodies against surface antigens CD3, CD4, CD8, CD16, CD22. Evaluation of functional lymphocyte reactivity was performed by setting 5 mg/ml PHA-stimulated RBTL. Phagocytic activity was defined by latex method. The NBT-test was used to evaluate the metabolic capacity of phagocytes. The CIC in serum were defined by method of selective 3.5% PEG precipitation of antigen complexes. Complementary activity of blood serum was determined by 50% hemolysis. The content of IFN- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  in supernatants was determined by ELISA after 24 hours of PBMC incubation. **Results and discussion.** The level of immunodeficiency disorders expression by herpes infection depended on the frequency of relapses during the year. A decrease of white blood cells number and relative content of lymphocytes of about 1.6 times as compared to the control group was observed in patients with a high relapse rate of recurrent HSV. Herewith, the relative content of CD8 + lymphocytes was 1.4 times lower than the control and 1.5 times lower than the same index in patients with moderate recurrent HSV relapse rate, and reduction of RBTL stimulation index was expressed stronger as compared with the control group. Levels of serum IgA and IgG were increased 2.1 times and 1.7 times respectively relative to the control group. Concentration of CIC in serum of patients in both groups exceeded the control which points to the failure of elimination function. A significant decrease in phagocytic activity in both groups in patients with recurrent HSV was more expressed in the group with high frequency of relapses. Also the decrease metabolic reserves were found in both groups of patients which points to the phagocytic function disorder. Elevated level of B-lymphocytes and increased level of immunoglobulins points to the activation of humoral immunity. Activity of complement in patients with recurrent HSV was significantly higher than controls (1.4 times) in the group with high frequency of relapses. Expressed deficiency of IFN- $\alpha$  compared with controls and patients with moderate frequency of relapses were observed in the group of patients with a high relapse rate. The level of spontaneous production of IFN- $\alpha$  was elevated 1.6 times compared to control in patients with moderate frequency of recurrent HSV relapses, and the level of spontaneous production of IFN- $\gamma$  was elevated 1.3 times compared to control group. In our previous studies we have determined that the content of perforin-positive cytotoxic lymphocytes in patients with a high frequency of disease relapses was reduced 2 times relative to healthy donors. It was shown that HSV-inactivated vaccine was able to elevate the content of perforin-positive cytotoxic lymphocytes in patients with moderate and high recurrence rate; herewith the largest index of influence of HSV-antigen was defined in patients with a high frequency of relapses. HSV-induced production of IFN- $\alpha$  increased 3 times in patients with moderate frequency of relapses and it had no significant difference from the control group, and in patients with a high relapse rate - 2.3 times. Reserve ability to synthesize IFN- $\gamma$  in

patients with moderate frequency of HSV relapses remained at the level of index of almost healthy donors, while the expressed reduction of stimulating action of HSV antigen was observed in patients with a high relapse rate. We have previously shown that the high recurrence rate of herpes infection accompanies by reduction of levels of TNF- $\alpha$ , by increase of spontaneous and induced production of IL-10 (in 76% patients), IL-12 and IL-1 $\beta$  by monocyte cells (in 85% of cases). Herewith 67% of patients with a high frequency of disease relapses had an imbalance of IL-12p70/IL-12p40, and 43% of patients had increased production of IL-1 receptor antagonist. It was determined that incubation of PBMCs with the addition of recombinant IFN- $\alpha$  causes a significant increase of the production of IFN- $\gamma$  in patients with moderate relapse rate and also in the control group (stimulation index 1.3). The level of interferon-induced IFN- $\gamma$  had no significant difference from the basal level in patients with a high relapse rate. Regulatory effect of IFN- $\alpha$  manifested also as increase of production of IL-1 $\beta$ , herewith the increase of the ratio IL-1 $\beta$ /IL-1RA was noted in patients with a high relapse rate. Stimulation of IFN- $\alpha$  in patients with a high relapse rate leads to 1.4 times increase of induced production of IL-10 by cells of monocyte fractions of MNC. The influence of IFN- $\alpha$  on the relative content of perforin-positive lymphocytes in patients with recurrence HSV was less expressed as compared to HSV-vaccine. So the stimulation index in patients with moderate relapse rate was 1.4, while patients with high relapse rate had stimulation index 1.2. Thereby, the choice of immunotherapeutic strategy of treatment of recurrent herpes infection of the oropharynx requires the immunological test to clarify the HSV pathogenesis type. **Keywords:** recurrent herpes simplex infection, immunodeficiency, interferons, cytokines, cytotoxic lymphocytes, immunocorrection