

DOI: 10.26693/JMBS02.05.092

УДК 616.98:578.825:612.017

Лядова Т. І., Волобуєва О. В.,
Загороднєва О. В., Гаміловська А. П.

ДОСЛІДЖЕННЯ ДИНАМІКИ ПОКАЗНИКІВ ІМУННОЇ ВІДПОВІДІ У ХВОРИХ НА ВЕБ-ІНФЕКЦІЮ

Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

t.lyadova@karazin.ua

У хворих на інфекційний мононуклеоз (ІМ) (n=30) та хронічну ВЕБ-інфекцію (ХВЕБ) (n=30) та 20 пацієнтів контрольної групи досліджено характер та комплексний стан субпопуляції реагуючих клітин імунної відповіді. При проведенні дослідження були дотримані всі етичні норми згідно міжнародних та українських протоколів. Клінічне обстеження хворих на ВЕБ та здорових пацієнтів передбачало вивчення скарг, епідеміологічного анамнезу, анамнезу захворювання та життя, об'єктивний огляд, стандартні інструментальні та лабораторні дослідження в динаміці, виявлення реплікативної активності ДНК ВЕБ та комплексний аналіз стану імунної відповіді. Основні субпопуляції лімфоцитів периферійної крові (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺, CD20⁺, CD25⁺) визначали з використанням набору моноклональних та поліклональних антитіл для визначення диференційованих антигенів лейкоцитів методом імунофлуоресцентної мікроскопії виробництва ООО „Сорбент” (Росія) відповідно до інструкції виробника. Для дослідження вмісту Іg класів А, М, G в сироватці крові застосовували метод простої радіальної імунодифузії в гелі. Концентрацію ЦІК в крові визначали по Діжону.

Результати досліджень опрацьовано методом варіаційної та кореляційної статистики з використанням програми «Statistica 10.0 for Windows», також використовувалися методи параметричної й непараметричної статистики. Встановлено, що імунна відповідь у хворих на ІМ в період розпалу захворювання характеризується дисбалансом клітинної ланки (про що свідчить підвищення вмісту CD3⁺, CD4⁺, та одночасне підвищення вмісту CD16⁺, CD25⁺), активацією гуморальної ланки (підвищення вмісту CD20⁺, Іg А, Іg М, Іg G) імунітету. В періоді реконвалесценції виявлені порушення зберігаються не досягаючи показників контрольної групи у більшій кількості хворих на ІМ. Отримані результати свідчать про значні зміни структурних характеристик системи клітинної та гуморальної ланок імунітету та різноспрямованість імунної відповіді при гострому та хронічному перебігу захворювання. Прогресуючий характер змін імунних

показників як при ІМ, так і ХВЕБ вказує на формування вторинного клітинного імунного дисбалансу, активації гуморальної ланки імунного захисту, зміною рівноваги імунорегуляторних медіаторів у бік Th2-ланки при формуванні хронічних форм ВЕБ-інфекції.

Ключові слова: вірус Епштейна-Барр, інфекційний мононуклеоз, хронічні форми ВЕБ-інфекції, імунна відповідь.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана на кафедрі загальної та клінічної імунології та алергології медичного факультету Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна та клінічних баз кафебри Обласної клінічної інфекційної лікарні м. Харкова і КЗОЗ «Міська поліклініка №6» м. Харкова в 2009-2016 рр. в рамках науково-дослідної теми: «Вивчення ролі імунних, аутоімунних та метаболічних порушень в патогенезі та наслідках інфекційного процесу, викликаного герпесвірусами», № державної реєстрації 0112U005911.

Вступ. Кардинальним завданням сучасної інфекційної імунології є з'ясування імунопатогенетичних механізмів неблагоприємного перебігу хвороби. Перебіг інфекційного процесу зумовлений як факторами вірусу, так і факторами макроорганізму. В основі ускладненого перебігу або хронізації процесу лежить неефективна імунна відповідь, яка є неспроможною в запобіганні дисемінації вірусу або в повній елімінації збудника з організму, що є причиною формування рецидивів або хронічного перебігу захворювання. В сучасній літературі містяться дані про те, що у пацієнтів, які перенесли інфекційний мононуклеоз (ІМ), незалежно від важкості перебігу хвороби, розвивається вторинний імунодефіцит, що є причиною можливих бактеріальних ускладнень [2, 10, 16].

Після перенесеного ІМ не завжди спостерігається поновлення імунного балансу та тривалий час зберігаються зміни в гемограмі.

Імунологічний статус хворих на ІМ має ряд особливостей. Суть загальної закономірності змін

полягає в збільшенні при ІМ числа Т- і В-лімфоцитів, а в субпопуляції Т-лімфоцитів – зростання кількості цитотоксичних клітин, що дозволяє розцінювати ІМ як лімфопроліферативний процес [9, 10, 12]. Підвищення рівня Т-лімфоцитів з супресорною активністю при ІМ є одним з основних регуляторних механізмів пригнічення ранніх етапів експресії В-лімфоцитів, як безпосередньо впливаючи на них, так і опосередковано, інгібуючи активацію Т-хелперів. У свою чергу зниження Т-хелперів призводить до блокування індукції апоптозу. Отже, при ІМ відбувається сповільнення апоптозу «відпрацьованих» ефекторних клітин і відсутня перешкода для їх участі в імунній відповіді. В кінцевому підсумку, при ВЕБ – інфекції може з'явитися вірогідність виникнення аутореактивних, а також злоякісних клонів клітин [12, 13].

Ряд дослідників відзначають з боку гуморальної ланки імунітету підвищення кількості IgA і IgM, що є характерним для важких форм ІМ [13].

Крім того, багатьма дослідниками активно вивчається взаємозв'язок між тяжкістю перебігу та окремими показниками імунної системи. Безумовно, ефективною імунною відповіддю на ВЕБ-інфекцію є активація гуморальних та клітинних механізмів. При первинній інфекції формуються нейтралізуючі антитіла, антитіла класів IgM та IgG до VCA, пізніше – до EA та NA антигенів ВЕБ [14, 16]. Вважається, що легкий перебіг ІМ пов'язано з ефективною імунологічною захистом Т-клітинної ланки імунітету і високим рівнем α -ІФН. Важкий перебіг інфекції обумовлено недостатністю як клітинної, так і гуморальної ланки імунітету, що супроводжується низькими концентраціями α -ІФН, реверсією продукції ІФН з α на γ -тип і порушенням виведення загальних ЦІК [12, 14, 16].

Взаємодія ВЕБ з імунною системою людини при хронічних формах інфекції також часто призводить до порушень функціонування останньої [2, 3]. Широкий діапазон можливих клінічних форм та наслідків ВЕБ-інфекції від спонтанного одужання до декомпенсованих ускладнень, маніфестації онкологічних та аутоімунних процесів припускає складну багатофакторну систему відносин вірусу та макроорганізму [3, 5, 6].

Кількість досліджень, присвячених вивченню характеру імунних розладів лабораторних проявів ІМ залежно від стадії інфекційного процесу у дорослих пацієнтів в нашій країні, дуже обмежена. Потребує також уточнення діагностична значимість специфічних методів ІФА і ПЛР в різні стадії інфекційного процесу.

Мета дослідження. Дослідити характер і ступінь порушень клітинної, гуморальної та фагоцитарної ланки імунітету у хворих на ВЕБ-інфекцію.

Матеріали та методи дослідження. Для виконання поставлених завдань дослідження нами були обстежені 321 пацієнт з ВЕБ-інфекцією, серед них ІМ встановлено у 43% (n=138), хронічну форму ВЕБ-інфекції (ХВЕБ) – 57% (n=183).

Вік обстежених пацієнтів знаходився в діапазоні від 18 до 57 років (середній вік 33,1 років \pm 11,7 років). Жінки становили 57,6% (n=185), чоловіки – 42,4% (n=136) (співвідношення жінки:чоловіки 1,2 : 1,0). Серед обстежених хворих на ІМ і ХВЕБ переважали особи жіночої статі (57,6 і 62% відповідно), середній вік склав (24,5 \pm 2,2 і 33,8 \pm 3,1 року, відповідно).

Діагноз ІМ у пацієнтів, що знаходилися під нашим спостереженням, був поставлений на підставі клініко-анамнестичних та лабораторних даних. Всі хворі перенесли середньо-тяжку форму ІМ.

У комплекс обстеження хворих входили клінічний аналіз крові, виявлення атипичних мононуклеарів, визначення специфічних Ig до ВЕБ методом твердофазного імуоферментного аналізу (тІФа), виявлення ДНК ВЕБ методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в крові і слині в динаміці захворювання. Для підтвердження діагнозу, крім загального аналізу крові, виконували комплекс серологічних і молекулярно-генетичних досліджень. Як скринінговий експрес-аналіз крові на наявність інфекції ВЕБ застосовували Гетерофільні тест в модифікації Гоффа-Бауера (ГБ) (Чірешкіна Н. М., 1973).

Специфічні протівірусні антитіла (VCA-IgM, EA-IgM і EBNA-IgG) в сироватці крові визначали методом тифу наборами виробництва «IBL» (Німеччина) і «Вектор-Бест» (РФ) відповідно до наведених інструкцій. У частини пацієнтів для диференціальної діагностики проводили серологічні обстеження на вірус простого герпесу 1 + 2 типу (ВПГ-1 + 2), цитомегаловірус (ЦМВ), токсоплазму, віруси гепатитів (А, В і С), ВІЛ. Для цього використовували відповідно наступні тест-системи для тифу: анти-ЦМВ-IgM, анти-Токсо-IgM, анти-ВГА-IgM, HBsAg, анти-HBc-total і анти-ВІЛ-1 + 2 total виробництва: НВО «Діапроф» (Україна), «Діагностичні системи» (РФ), «Вектор-Бест» (РФ), «IBL» (Німеччина).

Комплексний аналіз стану імунної відповіді було проведено у 30 хворих на ІМ у динаміці захворювання та 30 хворих на ХВЕБ-інфекцію. Основні субпопуляції лімфоцитів периферійної крові (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺, CD20⁺, CD25⁺) визначали з використанням набору моноклональних та поліклональних антитіл (АТ) для визначення диференційованих антигенів (АГ) лейкоцитів методом імуофлуоресцентної мікроскопії виробництва ООО «Сорбент» (Росія) відповідно до інструкції виробника. Для дослідження вмісту Ig класів А, М, G в

Таблиця 1 - Субпопуляційний склад лімфоцитів периферійної крові хворих на ІМ (M±m)

Групи хворих		CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD16 ⁺	CD20 ⁺	CD25 ⁺	IPI
ІМ, період розпалу (n=30)	(%)	84,21±1,34 ^{1,2}	34,16±1,07 ^{1,2}	44,16±3,78 ¹	12,61±0,6	18,91±0,37 ¹	21,40±1,92 ¹	0,75±0,06 ¹
	(×10 ³ /мк)	4,42±0,06 ^{1,2}	1,32±0,03 ^{1,2}	2,41±0,03 ^{1,2}	0,6±0,02 ¹	0,36±0,02 ¹	1,46±0,08 ^{1,2}	
ІМ, період реконвалесценції (n=30)	(%)	79,21±1,29 ¹	37,6±0,98 ¹	36,6±2,7 ¹	13,8±0,46	18,11±0,23 ¹	19,41±1,86	0,98±0,05 ¹
	(×10 ³ /мк)	2,76±0,03 ¹	0,88±0,03	1,24±0,03 ¹	0,53±0,01 ¹	0,39±0,01 ¹	0,67±0,03 ¹	
Контроль (n=20)	(%)	71,5±1,5	42,0±1,31	29,4±1,9	14,52±0,44	13,5±0,41	16,0±1,45	2,46±0,12
	(×10 ³ /мк)	1,63±0,08	0,84±0,05	0,48±0,09	0,3±0,01	0,27±0,02	0,35±0,03	

Примітки: ¹ – вірогідна різниця з показниками контрольної групи (p<0,05); ² – вірогідна різниця з показниками періоду реконвалесценції (p<0,05).

сироватці крові застосовували метод простої радіальної імунодифузії в гелі [2, 3, 6]. Концентрацію ЦІК в крові визначали по Діжону [2, 3, 8].

Усі досліді проводили у відповідності до Конвенції Ради Європи «Про захист прав людини і людської гідності в зв'язку з застосуванням досягнень біології та медицини: Конвенція про права людини та біомедицину (ETS № 164)» від 04.04.1997 р і Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації (2008 г.). Кожен пацієнт підписував інформовану згоду на участь у дослідженні.

Результати досліджень опрацьовано методом варіаційної та кореляційної статистики з використанням програми «Statistica 10.0 for Windows». Для кожного варіаційного ряду розраховували середню арифметичну (M), середнє квадратичне відхилення (σ), середню помилку середньої арифметичної (m). Також використовувалися методи параметричної й непараметричної статистики. Кількісний і якісний аналіз внутрішньосистемних і міжсистемних кореляційних зв'язків проводився з використанням методу кореляційних структур та послідовного аналізу Вальда.

Результати дослідження. Комплексний аналіз стану імунної відповіді, його характеру та інтенсивності, балансу субпопуляцій реагуючих клітин, продукції імунорегуляторних молекул має велике значення у вивченні патогенезу та клініки ВЕБ-інфекції, що в кінцевому результаті, сприяє ідентифікації протівірусної стратегії організму.

Субпопуляційний склад основних лімфоцитів з фенотипічними маркерами CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺, CD20⁺, CD25⁺, а також показники, що

відображають стан гуморальної імунної відповіді – вміст ЦІК та Іg А, М, G вивчали у периферійній крові хворих на ІМ у динаміці захворювання – у періоді розпалу та реконвалесценції (перед випискою із стаціонару). Отримані результати відображені в **табл. 1 та 2**.

Аналіз результатів дослідження вмісту відносних та абсолютних показників основних субпопуляцій лімфоцитів виявив гетерогенність вмісту цих імунокомпетентних клітин у періоді розпалу захворювання. Як видно з **табл. 1**, субпопуляційний склад лімфоцитів у групі хворих на ІМ характеризувався певними якісними та кількісними відмінностями порівняно з показниками контрольної групи.

Так, в періоді розпалу ІМ в периферійній крові хворих на фоні підвищеного вмісту лейкоцитів спостерігалось вірогідне підвищення відносної та абсолютної кількості деяких субпопуляцій лімфоцитів порівняно з даними контрольної групи хворих.

Так, рівень CD3⁺ складав (84,21 ± 1,34% та 4,42 ± 0,06 × 10³/мкл); CD8⁺ (44,16 ± 3,78% та 2,41 ± 0,03 × 10³/мкл); CD20⁺ (18,91 ± 0,47% та 0,36 ± 0,02 × 10³/мкл); CD25⁺ (21,4 ± 1,92% та 1,46 ± 0,08 × 10³/мкл), (p<0,05) порівняно з аналогічними показниками контрольної групи [CD3⁺ (71,5 ± 1,5% та 1,63 ± 0,08 × 10³/мкл); CD8⁺ (29,4 ± 1,9% та 0,48 ± 0,09 × 10³/мкл); CD20⁺ (13,5 ± 0,41% та 0,27 ± 0,02 × 10³/мкл); CD25⁺ (16,0 ± 1,45% та 0,35 ± 0,03 × 10³/мкл)]. Достовірно нижчими за контроль виявилися рівні CD4⁺ (34,16 ± 1,07% та 1,32 ± 0,03 × 10³/мкл) проти CD4⁺ (42,0 ± 1,31% та 0,84 ± 0,05 × 10³/мкл) та IPI (0,75 ± 0,06) проти (2,46 ± 0,12), (p<0,05).

Таблиця 2 – Вміст ЦІК та Іg у периферійній крові хворих у динаміці ІМ (M±m)

Групи хворих	ЦІК (од.)	Ig A (r/л)	Ig M (r/л)	Ig G (r/л)
ІМ, період розпалу (n=30)	13,96±0,48	4,30±0,18 ¹	1,98±0,11 ^{1,2}	14,52±1,20 ¹
ІМ, період реконвалесценції (n=30)	13,62±0,57	4,21±0,2 ¹	1,54±0,12 ¹	16,05±1,16 ¹
Контроль (n=20)	12,0±1,3	2,23±0,61	0,99±0,27	11,58±0,9

Примітки: ¹ – вірогідна різниця з показниками контрольної групи (p<0,05); ² – вірогідна різниця з показниками в періоді реконвалесценції (p<0,05).

Слід зазначити, що у цьому періоді вміст CD16⁺ складав (12,61 ± 0,6% та 0,6 ± 0,02 × 10³/мкл), що не відрізнялося статистичною вірогідністю з показниками контрольної групи у процентному відношенні CD16⁺ (14,52 ± 0,44%), (p>0,05), але в абсолютній кількості ці рівні були статистично вірогідними (0,30 ± 0,01 × 10³/мкл) (p<0,05).

При оцінці субпопуляційного складу лімфоцитів у хворих на ІМ у періоді розпапу хвороби спостерігалася проліферація Т-клітин (рис. 1).

Майже у 80% хворих виявлено підвищення Т-клітин. При чому збільшення даних клітин спостерігалось в основному за рахунок CD8⁺ та CD3⁺ лімфоцитів. У 60% хворих спостерігалось збільшення рівнів CD4⁺ та у 50% відзначались підвищенні показники НК-клітин, тобто на момент надходження в стаціонар половина хворих відповіла на інфікування вірусом Епштейна-Барр підвищенням кількості клітин з цитотоксичною активністю.

Кількість пацієнтів з підвищеним рівнем В-клітин відзначалася у третини хворих на ІМ (33%), т.ч. спостерігалася проліферація В-клітин, які в подальшому повинні були перейти в плазматичні клітини й почати продукувати антиген-специфічні антитіла. З іншого боку, враховуючи, що ВЕБ має лімфотропність до В-клітин, можна дійти висновку, що збільшення кількості В-лімфоцитів може сприяти збільшенню «резервуара» для вірусу. У 16,6% відзначалося зниження кількості CD20⁺, що на нашу думку, відображало перехід в антитіло продукуючі клітини або апоптоз інфікованих В-клітин та їх елімінацію.

В періоді реконвалесценції відбувалося вірогідне зниження вмісту більшості досліджуваних субпопуляцій лімфоцитів порівняно з аналогічними у розпапі ІМ. Так, як абсолютні так і відносні середні показники CD3⁺ (79,21 ± 1,29% та 2,76 ± 0,03 × 10³/мкл) відзначались вірогідністю порівняно з значеннями CD3⁺ (79,21 ± 1,29% та 2,76 ± 0,03 × 10³/мкл) (p<0,05) цього періоду. Інші лімфоцити відрізнялися

вірогідністю лише в абсолютних кількостях, а в процентному відношенні такої вірогідності виявлено не було: CD8⁺ (36,6 ± 2,7% проти 44,16 ± 3,78% (p>0,05), та 1,24 ± 0,03 × 10³/мкл проти 2,41 ± 0,03 × 10³/мкл, p<0,05); CD25⁺ (21,4 ± 1,92% проти 19,41 ± 1,86% (p>0,05), та 1,46 ± 0,08 × 10³/мкл проти 0,67 ± 0,03 × 10³/мкл, p<0,05). Вміст CD20⁺ та CD16⁺ не відрізнявся статистично між показниками у різних періодах ІМ і складав (18,91 ± 0,47% та 0,36 ± 0,02 × 10³/мкл проти 18,11 ± 0,37% та 0,39 ± 0,1 × 10³/мкл), (p>0,05) та (12,61 ± 0,6% та 0,6 ± 0,02 × 10³/мкл проти 13,8 ± 0,46% та 0,53 ± 0,01 × 10³/мкл), (p>0,05). Показники ІРІ у різних періодах ІМ також не мали статистичної вірогідності 0,75 ± 0,06 проти 0,90 ± 0,05, (p>0,05). Слід зазначити, що рівень CD4⁺ у періоді реконвалесценції значно збільшився порівняно з розпапом ІМ у процентному відношенні і складав (37,6 ± 0,98% проти 34,16 ± 1,07%), (p<0,05), тоді як у абсолютних значеннях навпаки (0,88 ± 0,03 × 10³/мкл проти 1,32 ± 0,03 × 10³/мкл) (p<0,05), (рис. 2).

Слід зазначити, що показники субпопуляційного складу лімфоцитів крові у періоді реконвалесценції як у процентному, так і абсолютному вмісті зберігалися підвищеними порівняно з контрольними значеннями для CD3⁺, CD8⁺, CD20⁺ та ІРІ (p<0,05). В цьому періоді зостається достовірно зниженим процентний вміст CD4⁺ (p<0,05), але абсолютні значення майже досягають контрольних значень (p>0,05). Рівні CD16⁺ не відрізнялися статистично між показниками групи контролю для процентного співвідношення (p>0,05), але абсолютна кількість їх статистично перевищувала контрольні показники (p<0,05). Рівень експресії Т-лімфоцитами активаційного маркера CD25⁺ вдвічі зменшився порівняно з гострим періодом ІМ, але в той самий час статистично перебільшує показники контрольної групи для абсолютних значень (p<0,05).

Як видно з малюнку підвищенні рівні CD8⁺ зберігалися майже у 67%, у половини хворих

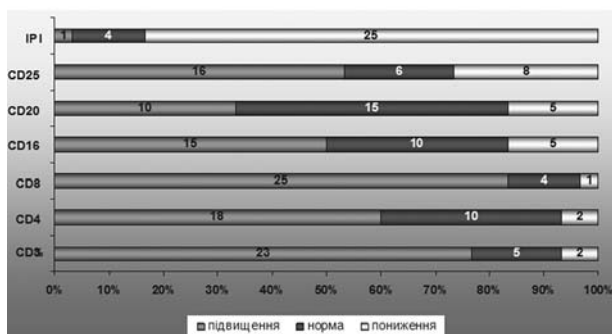


Рис. 1. Показники субпопуляційного складу лімфоцитів у хворих на ІМ у періоді розпапу хвороби

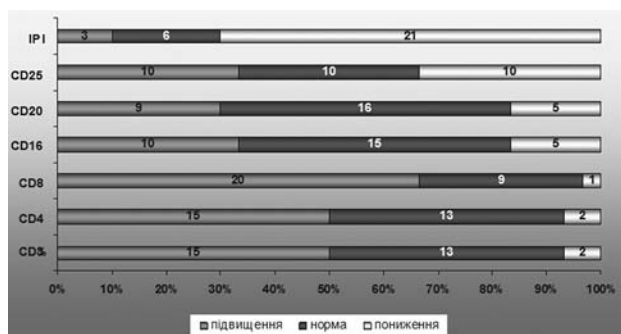


Рис. 2. Показники субпопуляційного складу лімфоцитів у хворих на ІМ у періоді реконвалесценції

Таблиця 3 – Субпопуляційний склад лімфоцитів периферійної крові при ХВЕБ ($M \pm m$)

Групи хворих		CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD16 ⁺	CD20 ⁺	CD25 ⁺	IPI
ХВЕБ (n=30)	(%)	78,21±1,15 ¹	39,16±1,02	37,11±2,28 ¹	18,51±0,6 ¹	18,23±0,32 ¹	19,40±1,72 ¹	1,84±0,08 ¹
	(×10 ³ /мк)	3,22±0,06 ¹	0,86±0,04	1,43±0,03 ¹	0,62±0,02 ¹	0,31±0,02	0,39±0,08	
Контроль (n=20)	(%)	71,5±1,5	42,0±1,31	29,4±1,9	14,52±0,44	13,5±0,41	16,0±1,45	2,46±0,12
	(×10 ³ /мк)	1,63±0,08	0,84±0,05	0,48±0,09	0,3±0,01	0,27±0,02	0,35±0,03	

Примітка: ¹ – вірогідна різниця з показниками контрольної групи ($p < 0,05$).

спостерігались підвищені рівні CD3⁺ та CD4⁺, у половини хворих відбувалась нормалізація рівнів CD16⁺ та CD20⁺. У третини хворих рівні CD25⁺ були підвищені, у іншій третини показники нормалізувалися, а у останньої третини спостерігалися низькі рівні CD25⁺. IPI зберігався зниженим як у періоді розпалу, так і в періоді реконвалесценції у домінуючій кількості хворих (70%).

Стан гуморальної імунної відповіді вивчався шляхом оцінки вмісту ЦІК та загальних неспецифічних Іg основних класів (А, М, G) в периферійній крові хворих на ІМ в динаміці захворювання. Результати проведеного дослідження представлені в **табл. 2**.

Аналіз даних дозволив встановити, що в періодах розпалу та ремісії у хворих на ІМ мають місце певні зміни вмісту показників гуморальної ланки імунітету порівняно з показниками контрольної групи. Так, у періоді розпалу виявляється вірогідне збільшення вмісту ЦІК (13,96 ± 0,48 од) порівняно з контрольною групою (12,0 ± 1,3 од), ($p < 0,05$).

Концентрація сироваткового Іg А (4,30 ± 0,18 г/л) відрізнялася статистичною вірогідністю від показника контрольної групи (2,23 ± 0,61 г/л), ($p < 0,05$), але з показниками періоду ремісії такої вірогідності визначено не було (4,21 ± 0,61 г/л), ($p > 0,05$). Також спостерігалось вірогідне підвищення рівнів Іg М в сироватці крові хворих (1,98 ± 0,11 г/л) порівняно з контрольною групою (0,99 ± 0,27 г/л), відповідно ($p < 0,05$) та показниками періоду ремісії (1,54 ± 0,12 г/л), ($p < 0,05$). Середня концентрація Іg G у хворих в періоді розпалу ІМ склала 14,52 ± 1,2 г/л і відрізнялася статистичною вірогідністю від аналогічного показника в контрольній групі (11,58 ± 0,9 г/л), ($p > 0,05$), однак з показниками у періоді реконвалесценції таких відмінностей не виявлено (16,05 ± 1,16 г/л), ($p < 0,05$).

При повторному обстеженні в періоді ремісії у хворих на ІМ спостерігалась наступна динаміка імунологічних показників: ЦІК мали тенденцію до зниження (13,62 ± 0,57 од) порівняно з періодом розпалу (13,96 ± 0,48 од), ($p > 0,05$), але їх середні показники вірогідно перевищували кількість ЦІК у контрольній групі (10 ± 1,3 од),

($p < 0,05$). Концентрація Іg А в сироватці крові хворих на ІМ в періоді реконвалесценції складала (4,21 ± 0,2 г/л) та статистично не змінювалась порівняно з такою в періоді розпалу (4,3 ± 0,18 г/л), ($p > 0,05$), але відрізнялась статистичною вірогідністю від контрольних значень (2,23 ± 0,61 г/л), ($p < 0,05$). Середні показники Іg М в періоді ремісії (1,54 ± 0,12 г/л) вірогідно знижувалися порівняно з періодом розпалу (1,98 ± 0,11 г/л), ($p < 0,05$), залишаючись при цьому вірогідно підвищеними порівняно з показниками контрольної групи (0,99 ± 0,27 г/л), ($p < 0,05$). І, навпаки, при аналізі концентрації Іg G в періоді реконвалесценції виявлено вірогідне підвищення його вмісту (16,05 ± 1,16 г/л) порівняно з аналогічним показником в періоді розпалу (14,55 ± 1,20 г/л), ($p > 0,05$) та в контрольній групі (11,58 ± 0,9 г/л) ($p < 0,05$).

У хворих на ХЕБВ в період загострення стан клітинної та гуморальної ланок імунної відповіді представлені в **табл. 3** та **4**.

Як видно із **табл. 3**, у хворих на ХЕБВ реєструвалось вірогідне підвищення порівняно з показниками контрольної групи відносної та абсолютної кількості лімфоцитів, що експресують антигени CD3⁺ (78,21 ± 1,15% та 3,22 ± 0,06 × 10³/мкл і 71,5 ± 1,5% та 1,63 ± 0,08 × 10³/мкл відповідно) ($p < 0,05$). Паралельно з цим відмічалось вірогідне збільшення відносної та абсолютної кількості CD8⁺-лімфоцитів (37,11 ± 2,28% та 1,43 ± 0,03 × 10³/мкл) порівняно з такими в контрольній групі (29,4 ± 1,9% та 0,48 ± 0,09 × 10³/мкл відповідно), ($p < 0,05$). Не був виключенням і вміст CD16⁺-лімфоцитів, що також характеризувалось вірогідним збільшенням їх кількості порівняно з показниками контрольної

Таблиця 4 – Вміст ЦІК та Іg у периферійній крові хворих на ХВЕБ ($M \pm m$)

Групи хворих	ЦІК (од.)	Іg А (г/л)	Іg М (г/л)	Іg G (г/л)
ХВЕБ (n=30)	18,62±0,57 ¹	2,55±0,2	1,34±0,12 ¹	18,05±1,16 ¹
Контроль (n=20)	12,0±1,3	2,23±0,61	0,99±0,27	11,58±0,9

Примітка: ¹ – вірогідна різниця з показниками контрольної групи ($p < 0,05$).

групи (відповідно $18,51 \pm 0,6\%$ та $0,62 \pm 0,02 \times 10^3/\text{мкл}$ ($p < 0,05$) проти $14,52 \pm 0,44\%$ та $0,3 \pm 0,01 \times 10^3/\text{мкл}$ ($p < 0,05$). Рівні $\text{CD}20^+$ та $\text{CD}25^+$ у хворих на ХВЕБ також були вірогідно підвищеними порівняно з контрольними значеннями у процентному співвідношенні, (відповідно $18,23 \pm 0,32\%$ та $19,4 \pm 1,72\%$ проти $13,5 \pm 0,41\%$ та $16 \pm 1,4$), ($p < 0,05$).

Однак у абсолютних значеннях статистичної вірогідності з показниками контролю виявлено не було: $0,31 \pm 0,02 \times 10^3/\text{мкл}$ та $0,39 \pm 0,08 \times 10^3/\text{мкл}$ проти $0,27 \pm 0,02 \times 10^3/\text{мкл}$ та $0,35 \pm 0,03 \times 10^3/\text{мкл}$, ($p > 0,05$). ІРІ в групі хворих на ХВЕБ ($1,84 \pm 0,08$) виявився вірогідно зниженим порівняно з таким у контрольній групі ($2,46 \pm 0,12$), ($p < 0,05$).

Як видно з **рис. 3**, при ХВЕБ відзначаються підвищені рівні $\text{CD}3^+$ та $\text{CD}4^+$ у 50% хворих, причому у 33% рівні $\text{CD}3^+$ знаходилися в межах значень контрольної групи, і лише у 16,7% рівні $\text{CD}3^+$ були пониженими. Схожа тенденція спостерігалась для показників $\text{CD}4^+$ які були у межах референтних значень у 20% хворих і у 30% знаходилися нижче показників контрольної групи. Стосовно рівнів $\text{CD}8^+$ спостерігалось рівномірний розподіл показників у межах підвищених, нормальних та знижених значень.

Рівні $\text{CD}16^+$, навпаки частіше були нижчими за референтні значення (40% хворих), у інших випадках вони коливались в межах контрольних значень, або були підвищеними у 33% хворих. Рівні $\text{CD}20^+$ частіше реєструвалися у хворих на ХВЕБ у межах контрольної групи 53,3%, у 30% вони були підвищеними, а у 17,7% хворих, навпаки, підвищеними. Показники $\text{CD}25^+$ у третини хворих були підвищені, у іншій третини показники були нормальними, а у останньої третини спостерігалися низькі рівні $\text{CD}25^+$. ІРІ зберігався зниженим у 46,7% хворих з ХВЕБ, у 26,7% він знаходився у межах норми, та у 26,6% був підвищеним.

В **табл. 4** представлено вміст ЦІК та Іg основних класів в периферійній крові хворих на ХВЕБ.

При цьому виявлено вірогідне підвищення вмісту ЦІК ($18,62 \pm 0,57$ од.), концентрації Іg М

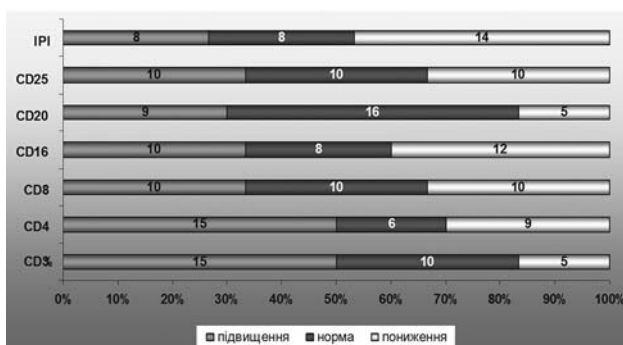


Рис. 3. Особливості параметрів імунної відповіді у хворих з ХВЕБ

($1,34 \pm 0,12$ г/л) та Іg G ($18,05 \pm 1,16$ г/л) порівняно з контрольною групою (відповідно $12 \pm 1,3$ од; $0,99 \pm 0,27$ г/л; $11,58 \pm 0,9$ г/л) ($p < 0,05$).

Концентрація сироваткового Іg А в периферійній крові хворих на ХВЕБ ($2,55 \pm 0,2$ од) не відрізнялась статистичною вірогідністю від середнього показника контрольної групи ($2,23 \pm 0,61$ од) ($p > 0,05$).

Обговорення. Таким чином, вивчення фенотипового спектру лімфоцитів крові у хворих на ІМ показало підвищення вмісту зрілих Т-лімфоцитів ($\text{CD}3^+$), цитотоксичних Т-супресорних клітин ($\text{CD}8^+$), клітин, що експресують активаційний маркер $\text{CD}25^+$ (рецептор ІЛ-2) як по відносим, так і по абсолютним показникам. Тоді як відносно Т-хелперів ($\text{CD}4^+$) було виявлено значне зниження процентної кількості та підвищення абсолютного числа $\text{CD}4^+$ та $\text{CD}16^+$ лімфоцитів відносно контрольних значень. Порушення процентного співвідношення $\text{CD}4^+/\text{CD}8^+$ клітин призвело до різкого падіння імунорегуляторного індексу. Крім того, підвищення кількості лімфоцитів, що несуть рецептор до ІЛ-2 ($\text{CD}25^+$) у гострому періоді ІМ, вочевидь свідчить про активацію імунної системи і збільшення кількості клітин, відповідаючих на ІЛ-2.

Отже, імунна відповідь у хворих на ІМ в період розпалу захворювання характеризується дисбалансом клітинної ланки (про що свідчить підвищення вмісту $\text{CD}3^+$, $\text{CD}4^+$, та одночасне підвищення вмісту $\text{CD}16^+$, $\text{CD}25^+$), активацією гуморальної ланки (підвищення вмісту $\text{CD}20^+$, Іg А, Іg М, Іg G) імунітету. В періоді реконвалесценції виявлені порушення зберігаються не досягаючи показників контрольної групи у більшій кількості хворих на ІМ.

Резюмуючи вищезазначене, можливо прийти до висновку що отримані результати свідчать про значні зміни структурних характеристик системи клітинної та гуморальної ланок імунітету та різноспрямованість імунної відповіді при гострому та хронічному перебігу захворювання. Прогресуючий характер змін імунних показників як при ІМ, так і ХВЕБ вказує на формування вторинного клітинного імунного дисбалансу, активації гуморальної ланки імунного захисту, зміною рівноваги імунорегуляторних медіаторів у бік ЦК Th2 при формуванні хронічних форм ВЕБ-інфекції.

Висновки

- У хворих на ІМ у періоді розпалу хвороби встановлені вірогідні порушення з боку клітинної ланки імунітету, що характеризувалося збільшенням кількості клітин з кілерною активністю: зрілих Т-лімфоцитів ($\text{CD}3^+$), цитотоксичних Т-супресорних клітин ($\text{CD}8^+$), клітин, що експресують активаційний маркер $\text{CD}25^+$ (рецептор ІЛ-2) та різке падіння ІРІ.
- У періоді реконвалесценції ІМ у більшій кількості хворих виявлено превалювання Th2-типу імунної

відповіді, що свідчить про затяжний період реко-
нвалесцентції та схильності до хронічного пере-
бігу захворювання.

3. При ХВЕБ виявлено достовірне підвищення як кількісного, так і якісного складу зрілих Т-лімфоцитів (CD3⁺), цитотоксичних Т-супресорних клітин (CD8⁺) та клітин (CD16⁺) на фоні низького IPI, що також свідчить про порушення параметрів клітинної ланки імунітету.

Перспективи подальших досліджень. Дослідження фенотипового спектру лімфоцитів крові у

хворих на різні форми ВЕБ-інфекції, обумовлюється необхідністю поліпшення клінічної та лабораторної діагностики цього захворювання для своєчасного виявлення ускладнень та призначення адекватної противірусної та імуномодельючої терапії. Тому вивчення ефективності нових схем комбінованої противірусної та імунокорегуючої терапії та дослідження їх впливу на показники клітинної та гуморальної ланок імунної відповіді є вельми актуальними та перспективними.

References

1. Cen O, Longnecker R. Latent Membrane Protein 2 (LMP2). *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015; 391: 151–80. DOI: 10.1007/978-3-319-22834-1_5.
2. Drutskaya MS, Belousov PV, Nedospasov SA. Vrozhdennoye raspoznavaniye virusov. *Molekulyarnaya biologiya*. 2011; 45 (1): 7–19. [Russian].
3. Griffin BD, Gram AM, Mulder A, Van Leeuwen D, Claas FH, Wang F, Rensing ME, Wiertz E. EBV BILF1 evolved to downregulate cell surface display of a wide range of HLA class I molecules through their cytoplasmic tail. *J Immunology*. 2013; 190: 1672–84. DOI: 10.4049/jimmunol.1102462.
4. Fathallah I, Parroche P, Gruffat H, Zannetti C, Johansson H, Yue J, Manet E, Tommasino M, Sylla BS, Hasan UA. EBV latent membrane protein 1 is a negative regulator of TLR9. *J Immunology*. 2010; 185: 6439–47. DOI: 10.4049/jimmunol.0903459.
5. Gaudreault E, Fiola S, Olivier M, Gosselin J. Epstein-Barr virus induces MCP-1 secretion by human monocytes via TLR2. *J Virology*. 2007; 81: 8016–24. DOI: 10.1128/JVI.00403-07.
6. Fish K, Chen J, Longnecker R. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A enhances MYC-driven cell cycle progression in a mouse model of B lymphoma. *Blood*. 2014; 123: 530–40. doi: 10.1182/blood-2013-07-517649.
7. Fukuda M, Kawaguchi Y. Role of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif of latent membrane protein 2A (LMP2A) in Epstein-Barr virus LMP2A-induced cell transformation. *J Virology*. 2014; 88: 5189–94. doi: 10.1128/JVI.03714-13.
8. Gibson J, Gow N, Wong SY. Expression and Funktion of innate Patten Recognition Receptors in T and B cells. *Immun, Endoc&Metab Agents in Med Chem*. 2010; 10: 11-20.
9. Guerreiro M, Na IK, Letsch A, Haase D, Bauer S, Meisel C, Roemhild A, Reinke P, Volk HD, Scheibenbogen C. Human peripheral blood and bone marrow EBV-specific T-cell repertoire in latent infection reveals distinct memory T-cell subsets. *Eur J Immune*. 2010; 15: 1566-76. DOI: 10.1002/eji.200940000.
10. Isakov VA, Arkhipova EI, Isakov DV. *Herpesvirusnyye infektsii cheloveka: rukovodstvo dlya vrachey*. SPb, 2006. 303 s. [Russian].
11. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010; 11 (5): 373–84. DOI: 10.1038/ni.1863.
12. Krasnitskaya AS, Borovskaya NA. Immunologicheskoye aspekty khronicheskogo tonzillita, assotsirovannogo s virus Epshteyna-Barr infektsiyey. *Fundamentalnyye issledovaniya*. 2012; 299–305. [Russian].
13. Kudin AP. Eta «bezobidnaya» virus Epshteyna – Barr infekciya. Chast 1. Harakteristika vzbuditelya. Reakciya immunnnoy sistemy na virus. *Medicinskie novosti*. 2006; 7: 25-32. [Russian].
14. Thorley-Lawson DA, Hawkins JB, Tracy SI, Shapiro M. The pathogenesis of Epstein-Barr virus persistent infection. *Curr Opin Virol*. 2013. 3: 227–32. DOI: 10.1016/j.coviro.2013.04.005.
15. Tugizov S, Herrera R, Veluppillai P, Greenspan J, Greenspan D, Palefsky JM. Epstein-Barr Virus (EBV)-Infected Monocytes Facilitate Dissemination of EBV within the Oral Mucosal Epithelium. *J Virol*. 2007; 81 (11): 5484-96. doi: 10.1128/JVI.00171-07.
16. Vozianova ZH, Hley AI. I. Infektsiyiny mononukleoz yak polietiolohichne zakhvoryuvannya. *Suchasni infektsiyi*. 2004; 2: 37-41. [Ukrainian].

УДК 616.98:578.825:612.017

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУННОГО ОТВЕТА У БОЛЬНЫХ ВЕБ-ИНФЕКЦИЕЙ

Лядова Т. И, Волобуева О. В., Загороднева О. В., Гамиловская А. П.

Резюме. У больных инфекционным мононуклеозом (ИМ) (n=30), хронической ВЕБ-инфекцией (ХВЕБ) (n=30) и 20 пациентов контрольной группы исследован характер и комплексное состояние субпопуляций клеток иммунного ответа. При проведении исследования были соблюдены все нормы международных и

украинских протоколов. Клиническое обследование больных ВЭБ и здоровых пациентов предусматривало изучение жалоб, эпидемиологического анамнеза, анамнеза заболевания и жизни, объективный осмотр, стандартные инструментальные и лабораторные исследования в динамике, выявление репликативной активности ДНК ВЭБ и комплексный анализ иммунного ответа. Основные субпопуляции лимфоцитов периферической крови (CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD20+, CD25+) определяли с использованием набора моноклональных и поликлональных антител для определения дифференцировочных антигенов лейкоцитов методом иммунофлуоресцентной микроскопии производства ООО «Сорбент» (Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Для исследования содержания Ig классов А, М, G в сыворотке крови применяли метод простой радиальной иммунодиффузии в геле. Концентрацию ЦИК в крови определяли по Дижону.

Результаты исследований обработаны методом вариационной и корреляционной статистики с использованием программы «Statistica 10.0 for Windows», также использовались методы параметрической и непараметрической статистики. Установлено, что иммунный ответ у больных ИМ в период разгара заболевания характеризуется дисбалансом клеточного звена (о чем свидетельствует повышение содержания CD3+, CD4+, и одновременное повышение содержания CD16+, CD25+), активацией гуморального звена (повышение содержания CD20+, Ig A, Ig M, Ig G) иммунитета. В периоде реконвалесценции у большего числа больных ИМ выявленные нарушения продолжают сохраняться, не достигая значений контрольной группы. Полученные результаты свидетельствуют о значительных изменениях структурных характеристик системы клеточного и гуморального звеньев иммунитета и разнонаправленность иммунного ответа при остром и хроническом течении заболевания. Прогрессирующий характер изменений иммунных показателей, как при ИМ, так и ХВЭБ указывает на формирование вторичного клеточного иммунного дисбаланса, активации гуморального звена иммунной защиты, изменением равновесия иммунорегуляторных медиаторов в сторону Th2-звена при формировании хронических форм ВЭБ-инфекции.

Ключевые слова: вирус Эпштейна-Барр, инфекционный мононуклеоз, хронические формы ВЭБ-инфекции, иммунный ответ.

UDC 616.98:578.825:612.017

Research of Dynamics of Immune Response Rates in Patients with Evb Infection

Liadova T., Volobueva O., Zagorodneva O., Gamilovskaya A.

Abstract. In patients with infectious mononucleosis (MI) (n=30), chronic EVB infection (HEVB) (n = 30), and 20 patients in the control group, the nature and complex state of the subpopulations of immune response cells was studied. During the research all norms of international and Ukrainian protocols were observed.

Clinical examination of patients with EVB and healthy patients included examination of complaints, epidemiological anamnesis, anamnesis of the disease and life, objective examination, standard instrumental and laboratory studies in dynamics, detection of replicative activity of EVB DNA and complex analysis of the immune response. The main subpopulations of peripheral blood lymphocytes (CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD20+, CD25+) were determined using a set of monoclonal and polyclonal antibodies to determine differentiation antigens of leukocytes by the method of immunofluorescence microscopy from LLC Sorbent (Russia) in accordance with the manufacturer's instructions. To study the Ig class content of A, M, G serum, the method of simple radial immunodiffusion in the gel was used. The concentration of the CEC in the blood was determined according to Dijon.

The results of the studies were processed by the method of variational and correlation statistics using the program "Statistica 10.0 for Windows", also methods of parametric and nonparametric statistics were used. It was found out that the immune response in patients with MI during the height of the disease was characterized by imbalance of the cell link (as evidenced by an increase in CD3+, CD4+, and a simultaneous increase in CD16+, CD25+), activation of the humoral unit (increase in CD20+, IgA, IgM, Ig G) immunity. In the period of reconvalence in a larger number of patients with MI, the revealed disorders were continued to persist, not reaching the values of the control group. The obtained results testify significant changes in the structural characteristics of the cellular and humoral immune system and the multidirectionality of the immune response in acute and chronic course of the disease. The progressive nature of changes in immune parameters in both MI and HBEB indicates the formation of a secondary cellular immune imbalance, activation of the humoral link of immune defense, a change in the equilibrium of immunoregulatory mediators towards the Th2-link in the formation of chronic forms of EBV infection.

Keywords: Epstein-Barr virus, infectious mononucleosis, chronic forms of EBV infection, immune response.

Стаття надійшла 29.09.2017 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування