

MEDICINE, REHABILITATION AND SPORTS

Зубченко С.А.

Прогностическое значение регуляторных Т-лимфоцитов при Епштейна-Барр вирусной инфекции

Зубченко Светлана Александровна, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры клинической иммунологии и аллергологии

Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого, г. Львов, Украина

Аннотация. Проведены комплексные клинические и специфические иммунологические исследования 52 пациентов с целью оценки количества регуляторных Т-лимфоцитов в различных стадиях хронического Эпштейна-Барр вирусного процесса. На основании данных полимеразной цепной реакции у 48,1% пациентов выявлено ДНК EBV, что указывало на рецидив EBV-инфекции с репликацией вируса, который подтвердился высокими титрами специфических EBV-VCA-IgG⁺ и клиническими проявлениями. У 51,9% пациентов диагноз хронической EBV-инфекции в латентной стадии верифицировали на основании наличия EBNA-IgG⁺ и низких титров специфических EBV-VCA-IgG⁺ на фоне отсутствия ДНК EBV. Определено, что у пациентов с EBV-инфекцией в стадии репликации показатели абсолютного количества Т-рег-клеток (CD4⁺/CD25⁺) были достоверно меньше (0,34 ± 0,08 Г/л, p < 0,05) по сравнению с лицами с EBV-инфекцией в латентной стадии (0,47 ± 0,09 Г/л) и здоровыми (0,50 ± 0,16 Г/л), что может быть предиктором формирования аутоиммунной или аллергической патологии.

Ключевые слова: хроническая Эпштейна-Барр вирусная инфекция, регуляторные Т-лимфоциты, иммунная система

Введение. Одной из потенциальных причин срыва иммунологической толерантности организма является наличие хронического инфекционного процесса, вызванного, в первую очередь, внутриклеточными возбудителями.

Краткий обзор публикаций по теме. По данным научной литературы, сегодня чаще всего триггерами срыва толерантности иммунных механизмов являются хламидии, парамиксовирусы, герпесвирусы, в том числе вирус Епштейна-Барра

(EBV) и т.д. [1, 4]. Уровень инфицированности взрослого населения этим вирусом составляет 90-100%. Для EBV характерно непосредственное инфицирование иммунокомпетентных клеток и полиорганный тропизм. Его ассоциируют с рядом лимфопролиферативных, аллергических и аутоиммунных заболеваний (ревматоидный артрит, системная красная волчанка, васкулиты, миастения гравис, неспецифический язвенный колит и др.). EBV особенно активно начинает реплицироваться на фоне снижения активности иммунной системы, в том числе при применении иммуносупрессивной терапии. Механизм инициации аутоагрессии при этом связывают с нарушением поддержки высокодозной иммунной толерантности к инфицированным клеткам. В свою очередь, иммунная система реагирует на активную репликацию вируса через включение защитных механизмов, в большей степени клеточных [3, 7, 11].

В последние годы значительное внимание уделяется изучению функций регуляторных лимфоцитов, которые проявляют супрессивную активность к аутоантигенам и инфекционным агентам. Ключевыми среди регуляторных клеток являются уникальная линия Т-клеток тимусного происхождения CD4⁺CD25⁺Foxp3, которые относятся к натуральным регуляторным Т-лимфоцитам (Т-рег). Считают, что около 5-10% циркулирующих Т-лимфоцитов здорового человека принадлежат к указанной популяции клеток. С активностью натуральных Т-рег связывают индукцию так называемой низкодозной толерантно-

сти [2, 6]. Другой субпопуляцией Т-рег клеток являются антиген-индуцированные регуляторные Т-лимфоциты, которые в первую очередь влияют на баланс Th1/Th2, ответственный за эффективность иммунного ответа [10, 13]. Эти лимфоциты различаются между собой условиями активации, поверхностным фенотипом и механизмом супрессивного действия. Первые из них - адаптивные CD4⁺CD25⁺Foxp3 Т-клетки - не отличаются от натуральных. Иммуносупрессивный эффект двух других субпопуляций опосредован продукцией IL-10 и трансформирующего фактора роста β (TGF-β) [9, 12, 14]. Антиген-специфические регуляторные Т-клетки не препятствуют нормальному иммунному ответу, однако способны существенно ослабить иммунную реакцию в условиях значительного самоповреждения. Считается, что именно эти клетки обуславливают формирование так называемой высокодозной толерантности, сущность которой заключается в блокировании эффекторного звена иммунного ответа при поступлении сверхбольших доз патогена. Высокодозная толерантность предотвращает развитие жизненно опасного синдрома системного воспалительного ответа [2, 8]. Дефицит/дефект регуляторных Т-лимфоцитов является одной из причин срыва иммунной толерантности к собственным антигенам и индукции аутоиммунного ответа, о чем свидетельствуют описанные клинические случаи наследственного дефекта молекулы Foxp3 [5].

Цель работы. Исследование количества регуляторных лимфоцитов у пациентов с EBV-инфекцией в различных стадиях активности хронического вирусного процесса.

Материалы и методы. Было обследовано 52 человека, которые находились на амбулаторном лечении и наблюдаются во Львовском региональном медицинском центре клинической иммунологии и аллергологии. Возраст обследуемых составлял 22,6 ± 2,4 лет, среди которых было 28 (53,8%) женщин и 24 (46,2%) мужчин. Всем пациентам выполнены клинические

лабораторные и специальные иммунологические обследования.

Проведено комплексное диагностическое исследование сывороток с определением серологических маркеров EBV (EBV-VCA-IgM/IgG, EBV-EBNA-IgG) методом непрямого двухступенчатого хемилюминесцентного иммуноанализа (CLIA) на тест-системах "DiaSorin" (Италия) с использованием анализатора "Liaison". Определение ДНК EBV в крови, слюне и соскобах со слизистой задней стенки глотки выполнялся методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на диагностикумах "AmpliSens" (Россия) при использовании "Rotor Geen 6000" (Corbett Research, Австралия). Фенотипирование лимфоцитов и определение экспрессии основных активизационных маркеров проводили с использованием моноклональных антител на проточном цитофлюориметре "Bekton Dickenson" (США).

Результаты исследований анализировали с использованием метода вариационной статистики с помощью программы STATISTICA 6 (Statsoft, USA).

Контрольную группу составили здоровые лица в количестве 20 человек соответствующего возраста и пола.

Результаты и их обсуждение. Результаты комплексного диагностического исследования сывороток крови с определением серологических маркеров показали, что у 52 (100%) человек выявлены антитела класса IgG к ядерному антигену EBV (EBNA-IgG+), что указывает на 100% инфицированность этим вирусом. В обследуемых лиц чаще всего (76,9%) верифицировали серологический профиль VCA-IgM-/IgG+ - EBNA-IgG+. Специфические EBV-VCA-IgM+ в различных ассоциациях были обнаружены у 10 (5,2%) человек с длительностью персистенции EBV до 2-х лет.

На основании клинических, лабораторных и специфических иммунологических исследований всех больных разделили на две группы.

Соответственно, по результатам ПЦР при исследовании слюны, крови и соскобов со слизистой задней стенки глотки установлено, что в 27 человек (51,9%) ДНК вируса не обнаружено. Диагноз хронической EBV-инфекции в латентной стадии верифицировали на основании наличия EBNA-IgG+ и низких титров специфических EBV-VCA-IgG+ по сравнению с контрольной группой. У пациентов с ДНК EBV (-) анамнестических и клинических признаков инфекционного вирусного процесса не наблюдали. Эти больные вошли в первую группу исследуемых лиц с ДНК EBV (-).

ДНК EBV (+) была обнаружена у 25 (48,1%) пациентов, причём, как в одном (21,7%), так и в нескольких биологических средах одновременно (78,3%). Среди них - у 18 человек титры специфических EBV-VCA-IgG+ были увеличены в 5-6 раз, а в семи - у 7-10 раз по сравнению с контрольной группой. На основании указанных данных пациентам был выставлен диагноз хронической EBV-инфекции в стадии репли-

кационной активности. Результаты детальных анамнестических данных и клинических обследований показали, что рецидивы хронической EBV-инфекции сопровождались следующими клиническими проявлениями: синдром хронической усталости - у 23 (92,0%) человек, синдром инфекционного иммунодефицита - у 17 (68,0%), синдром длительного субфебрилитета - у 16 (64,0%), синдром лимфаденопатии - у 13 (52,0%), аллергический синдром - в 11 (44,0%) и неврологический синдром - у 5 (20,0%) человек. Эти больные вошли во вторую группу лиц с ДНК EBV (+).

На основании сравнительного анализа фенотипической характеристики лимфоцитов и их активированных маркеров в указанных группах, пациентам с ДНК EBV (+) был выставлен диагноз приобретённого иммунодефицита инфекционного генеза по комбинированному лимфоцитарно-фагоцитарному типу. Результаты анализа T-reg-лимфоцитов (CD4+/CD25+) показали, что у лиц с ДНК EBV (+) абсолютное их количество было достоверно меньше ($0,34 \pm 0,08$ Г/л, $p < 0,05$) по сравнению с пациентами с ДНК EBV (-) ($0,47 \pm 0,09$ Г/л) и здоровыми лицами ($0,50 \pm 0,16$ Г/л). У пациентов с ДНК EBV (-) как относительное ($20,21 \pm 4,20\%$, $p > 0,05$), так и абсолютное количество ($0,47 \pm 0,09$ Г/л, $p > 0,05$) этих клеток практически не отличалась от показателей здоровых лиц со следующими данными: $20,50 \pm 4,20\%$, $0,50 \pm 0,16$ Г/л.

Полученные результаты указывают на наличие приобретённых иммунодефицитных нарушений инфекционного генеза по комбинированному лимфоцитарно-фагоцитарному типу у лиц с хронической EBV-инфекцией в стадии репликационной активности и возможное формирование срыва высокодозной иммунологической толерантности с последующим развитием иммунопатологии в виде аутоиммунных и аллергических реакций/синдромов.

Таким образом, опосредованная иммунологическим дефектом, хроническая EBV-инфекция в стадии репликации является потенциальным кандидатом на роль непосредственной причины срыва толерантности.

Выводы:

1. Инфицированность EBV обследуемых лиц составила 100%.
2. У лиц с хронической EBV-инфекцией в стадии репликации и в латентной стадии чаще всего верифицировался серологический профиль VCA-IgM-/IgG+, EBNA-IgG+ (76,9%).
3. ДНК EBV выявлено у 48,1% пациентов, что указывало на рецидив EBV-инфекции с репликационной активностью вируса и наличием клинических проявлений.
4. Вероятно меньшие ($0,34 \pm 0,08$ Г/л, $p < 0,05$) показатели количества T-reg-клеток (CD4+/CD25+) у пациентов с EBV-инфекцией в стадии репликации вируса по сравнению с лицами в латентной стадии ($0,47 \pm 0,09$ Г/л) и здоровыми ($0,50 \pm 0,16$ Г/л) являются предиктором формирования аутоиммунной или алергопатологии.

REFERENCES (REFERENCES TRANSLATED AND TRANSLITERATED)

1. Казмирчук В.С., Ковальчук Л.В., Мальцев Д.В. Клиническая иммунология и аллергология // Киев: Феникс, 2009. – 524 p.
Kazmyrchuk V.Ye., Koval'chuk L.V., Mal'cev D.V. Klinicheskaya immunologiya i allergologiya [Clinical allergology and immunology] // Kyiv: Phenix, 2009. – 524 p.
2. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология // М: Мир, 2000. – 581 с.
Rojt A., Brostoff J., Mail D. Immunologiya [Immunology] // M: Mir, 2000. – 581 p.
3. Сепиашвили Р.И. Основы физиологии иммунной системы // М: Медицина, 2003. – 239 с.
Sepiashvili R.I., Osnovi fiziologii immunoj sistemy [Fundamentals of physiology of the immune system] // M. Medicina, 2003. – 239 p.
4. Чоп'як В.В., Потьомкіна Г.О. Ефективність застосування Гропрінозину у хворих із хронічною інфекцією, зумовленою вірусом Епштейна-Барр, у стадії реплікації вірусу // Клінічна імунологія, алергологія, інфектологія. – 2011. - №4(43). – С. 60-68.
Chopyak V.V., Potyomkina H.O., Efektivnist' zastosovannya Groprinozinu u khvorikh iz khronichnoyu infekciyeu, zumovlenoyu virusom Epshtejn-Barr, u stadiyi replikaciyi virusu [Effectiveness of Gripponolin application in patients with chronic infection, defined by Epstein-Barr virus, at the stage of virus replication] // klinichna immunologiya, alergologiya, infektologiya. – 2011. - №4(43). – P. 60-68
5. Braun D.K., Dominges G., Pellet P.E. Human herpesvirus 6 // Clin. Microbiol. Rev. – 1997. - N 10. – P. 521-67.
6. Cassis L., Aiello.S, Noris M. Natural versus adaptive regulatory T cell // Contrib. Nephrol. – 2005. - Vol. 146. - P. 121-131.
7. Cohen J.I. Epstein-Barr virus infection // N. Engl. J. Med. – 2000. - Vol. 343. - P. 481-492.
8. d'Hennezel E., Yurchenko E., Sgouroudis E., Hay V., Piccirillo C.A. Single-cell analysis of the human T regulatory population uncovers functional heterogeneity and instability within Foxp3+ cells // J. Immunol. – 2011, Jun. - N 186 (1). – P. 6788-97.
9. Feuerer M., Hill J.A., Mathis D., Benoist C. Foxp3 regulatory T cell: differentiation, specification, subphenotypes // Nat. Immunol. – 2009, Jul. - N 10 (7). – P. 689-95.
10. Gurk P., Mills K. Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases // Trends in Immunol. – 2002. - Vol. 23. - N 9. - P. 450-455.
11. Kawa K. Epstein-Barr virus-associated diseases in humans // Inf. J. Hematol. – 2000. - Vol. 71. - P. 108-117.
12. Marcus F., Jonathan A.H., Marthis D. Foxp3+ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes // Nature Immunology. – 2009. - Vol. 10. - N 7. - P. 689-695.
13. Trinchieri G. Interleukin-10 production by effector T cell: Th1 cells show self control // J. Exp. Med. – 2007. - Vol. 204. - N 2. - P. 239-243.
14. Weiner H. Induction and mechanism of action of TGF- β -secreting regulatory cells // Immunol. Rev. – 2001. - Vol. 182. - P. 207-214.

Zubchenko S. Prognostic value of regulatory T lymphocytes in Epstein -Barr virus infection

Abstract. It was conducted a comprehensive clinical and specific immunological study of the 52-patients in order to assess the number of regulatory T cells in different stages of chronic Epstein-Barr virus (EBV) process. On the basis of polymerase chain reaction (PCR) in 48,1% of patients revealed EBV DNA, indicating that EBV infection relapse with replicative activity of the virus which was confirmed by high titers of specific EBV-VCA-IgG+ and clinical manifestations. In 51.9% of patients chronic EBV infection in a latent stage was verified on the basis of availability of EBNA-IgG+ and low titers of specific EBV-VCA-IgG + amid a lack of DNA EBV. It was determined that patients with EBV-infection in a replication step the absolute number of T-reg-cells (CD4+/CD25+) were significantly lower (0,34 \pm 0,08 g/l, p <0,05) in comparison with with patients in latent stage (0,47 \pm 0,09 g/l) and healthy people (0,50 \pm 0,16 g/l), which may be a predictor of forming an autoimmune or allergic disease.

Keywords: chronic Epstein-Barr virus infection, regulatory T cells, the immune system