

СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ГЕРПЕТИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИЕЙ ТЯЖЕЛОГО ТЕЧЕНИЯ

Новикова И.А., Злотникова М.В.

Гомельский государственный медицинский университет, кафедра клинической лабораторной диагностики, г. Гомель

Резюме. Определение субпопуляционного состава лимфоцитов при тяжелой герпетической инфекции является необходимым исследованием, однако интерпретация получаемых данных представляет определенную трудность вследствие незначительных или разнонаправленных изменений в иммунограмме больных. В данной работе изучены особенности иммунного статуса у больных хронической рецидивирующей герпетической инфекцией в период ремиссии заболевания. Представлен подробный индивидуальный анализ показателей иммунограммы с учетом частоты рецидивирования и других клинических особенностей течения герпетической инфекции. Описываются изменения характера корреляций субпопуляций лимфоцитов у больных хронической рецидивирующей герпетической инфекцией.

Ключевые слова: рецидивирующая герпетическая инфекция, иммунофенотипирование, субпопуляции лимфоцитов.

Novikova I.A., Zlotnikova M.V.

COMPOSITION OF LYMPHOCYTE SUBSETS IN THE PATIENTS WITH SEVERE FORMS OF HERPETIC INFECTION

Abstract. Evaluation of lymphocyte subsets in severe forms of herpetic infection is a necessary diagnostic test. However, interpretation of appropriate data is difficult, due to slight or multidirectional changes of immunological parameters in the patients. In present study, the indices of immune status were assessed in the patients with severe recurrent forms of chronic herpetic infection, being in remission period by the time of study. A detailed personalized analysis of immunological testing data is presented, with respect to the disease duration, recurrence frequency, and other clinical features of severe herpes infection. Various types of correlations between the lymphocyte subpopulations are described for the patients with severe recurrent herpetic infection. (*Med. Immunol.*, vol. 12, N 4-5, pp 331-336)

Keywords: recurrent herpetic infection, immunophenotyping, lymphocyte subsets.

Хроническая герпетическая инфекция представляет собой актуальную проблему, все еще далекую от своего решения. Это объясняется широкой распространенностью заболевания, недостаточной эффективностью, длительностью и дороговизной существующих методов лечения. В последнее время отмечается тенденция к увеличению количества больных хронической

рецидивирующей герпетической инфекцией (ХРГИ) во всем мире, и Республика Беларусь не является исключением. Так, за последнее десятилетие в Республике Беларусь количество больных ХРГИ увеличилось приблизительно в 3,5 раза. Наиболее распространенной формой герпетической инфекции является поражение кожи, которое в ряде случаев сочетается с различными проявлениями аногенитального герпеса [4].

В настоящее время доказано, что рецидивирование заболевания и дальнейшее его прогрессирование напрямую связаны с нарушениями иммунной реактивности организма [2, 3, 5].

Адрес для переписки:

Новикова Ирина Алексеевна
247023, Беларусь, г. Гомель, м-н Энергетиков,
30-д. 53, кв. 53
Тел.: +375 (292) 37-34-29, +375 (232) 37-70-73.
E-mail: ustinovamv@bk.ru

Хроническое рецидивирующее течение герпетической инфекции считается клиническим проявлением вторичной иммунологической недостаточности.

Важным диагностическим признаком для выявления нарушений функционирования иммунной системы является определение субпопуляционного состава и фенотипа лимфоцитов периферической крови. В то же время результаты различных авторов, касающиеся изменений этих параметров у больных ХРГИ, достаточно противоречивы. Имеются данные как о снижении общего количества Т- и В-лимфоцитов, CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов, соотношения иммунорегуляторных субпопуляций лимфоцитов и NK-клеток, так и их повышении [2, 3, 5, 6, 8]. Разнонаправленность изменений может быть связана с различиями в технологии выполнения иммунограмм, а также с клиническими особенностями заболевания (ремиссия или обострение, частота рецидивирования, наличие сопутствующей патологии и др.). Для повышения клинической информативности иммунологического тестирования требуется унификация подходов к обследованию данной категории больных, а также разработка оптимальных алгоритмов цитометрических исследований.

Цель исследования — изучить особенности субпопуляционного состава лимфоцитов у больных ХРГИ с различной частотой рецидивирования.

Материалы и методы

Обследовано 36 больных с тяжелой формой ХРГИ (4 мужчин и 32 женщин в возрасте от 18 до 45 лет), проходивших обследование и лечение в ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека» (г. Гомель). Критериями тяжелого течения считали более 6 рецидивов в год, длительность рецидивов более 14 дней, распространенный характер высыпаний, наличие симптомов общей интоксикации [2]. Продолжительность заболевания варьировала от 3 до 26 лет, при частоте рецидивирования от 6 до 19 раз в год. На момент обследования все пациенты находились в стадии клинической ремиссии. Диагноз ставили на основании анамнеза, объективного осмотра, лабораторных методов исследования. Контрольную группу составили 29 практически здоровых лиц сопоставимого возраста.

Материалом для исследования служила периферическая кровь, взятая из кубитальной вены в пробирку с гепарином (10 Ед/мл).

Фенотип лимфоцитов определяли с использованием моноклональных антител линии IOTest (Beckman Coulter, USA), меченных FITC (флуоресцеина изотиоцианат), PE (фикоэритрин), PC-5 (комплекс PE + цианин-5) в следующих панелях: CD3-FITC/CD4-PE/CD25-PC-5, CD3-FITC/CD56⁺CD16-PE/CD8-PC-5, CD3-FITC/CD19-PE/HLA-DR-PC-5. После пробоподготовки по методике «окраска — лизис с фиксацией — отмывка» анализ окрашенных клеток проводился на трехцветном проточном цитофлуориметре («PAS», Partec) в программе «Partec FloMax». Оценивали содержание CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD4⁺CD25⁺, CD3⁺HLA-DR⁺, CD3⁺CD16⁺/CD56⁺, CD19⁺, CD3⁺HLA-DR⁺ клеток.

Статистический анализ осуществлялся с использованием непараметрических тестов Манн-Уитни и Спирмена (r_s) для корреляционного анализа. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Данные представлены как медиана и интерквартильный размах (25–75%).

Результаты и обсуждение

Установление контрольных значений содержания лимфоцитов с различными мембранными маркерами в периферической крови здоровых взрослых людей было произведено на начальном этапе работы. Контрольную группу составили сотрудники Республиканского научно-практического центра радиационной медицины и экологии человека, а также студенты, которые по результатам анкетирования и лабораторного обследования (общий и биохимический анализ крови) не имели клинико-лабораторных признаков иммунологической недостаточности и сопутствующих заболеваний. Определение фенотипа лимфоцитов проводилось с использованием сертифицированных прибора и реактивов при адекватном контроле исследований. Полученные данные проточной цитофлуориметрии в донорской группе принципиально не отличались от результатов, приводимых другими исследователями [11, 12].

Содержание субпопуляций лимфоцитов у лиц с герпетической инфекцией представлено в таблице 1.

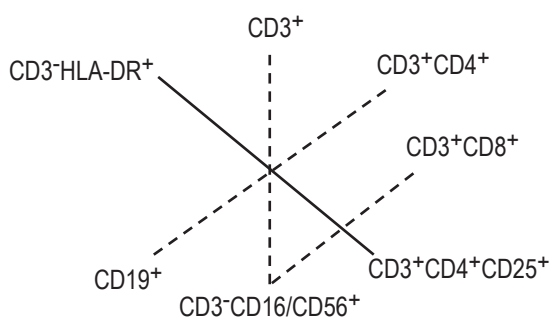
Как видно из таблицы 1, в общей группе больных ХРГИ на фоне снижения абсолютно-го количества лейкоцитов по сравнению со здоровыми лицами ($p = 0,03$) обнаруживалось повышение процентного содержания CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов ($p = 0,001$) с одновременным увеличением индекса соотношения CD4⁺/CD8⁺

ТАБЛИЦА 1. СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ХРГИ

Показатель, ед. изм.	Доноры, n = 29	Больные ХРГИ		
		Общая группа ХРГИ ремиссия, n = 36	I группа 6-9 обострений в год, n = 22	II группа 10-18 обострений в год, n = 14
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	6,1 (5,4-7,3)	5,1 (4,4-6,7) *	4,85 (4,2-6,9)	5,6 (4,5-7,7)
Лимфоциты, %	34,0 (27,0-39,5)	38,0 (30,0-45,0)	37,7 (26,7-44,0)	41,0 (31,0-45,0)
CD3 ⁺ , %	69,1 (62,8-74,0)	72,2 (67,4-77,4)	73,6 (66,7-76,8)	71,6 (67,9-78,6)
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ , %	1,5 (0,8-2,2)	1,5 (1,0-2,4)	1,7 (0,9-2,6)	1,5 (1,2-2,3)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , %	38,3 (33,9-43,1)	45,0 (40,7-48,5) *	42,7 (39,4-48,9) *	46,5 (43,4-48,1) *
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , %	24,6 (21,0-26,7)	22,2 (18,4-26,0)	22,2 (19,1-26,2)	21,8 (18,0-24,4)
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,57 (1,28-1,95)	2,20 (1,60-2,40) *	2,1 (1,5-2,4)	2,2 (1,6-2,4) *
CD19 ⁺ , %	10,2 (9,2-11,6)	11,1 (8,5-13,8)	9,5 (8,1-11,8)	11,4 (10,8-15,1)
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ , %	14,1(10,8-20,5)	10,6 (8,0-15,0) *	11,0 (7,9-16,0)	9,5 (8,8-13,0) *
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ , %	11,2 (10,4-12,8)	11,5 (9,4-14,3)	9,8 (8,1-13,6)	12,4 (11,5-15,7) **
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ , %	3,1 (2,1-4,0)	3,4 (2,2-5,1)	3,1 (1,9-3,8)	4,6 (3,3-5,8) (**)
CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁺ , %	3,8 (2,5-5,9)	3,8 (2,3-6,5)	3,4 (1,7-5,8)	5,2 (2,8-7,6)
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , %	6,6 (4,9-8,4)	4,7 (3,0-6,4) *	5,1 (3,0-6,5) *	3,8 (3,0-5,8) *

Примечание. * – различие значимо ($p < 0,05$) в сравнении с группой здоровых лиц, ** – различие значимо ($p < 0,05$) при сравнении I и II групп.

А



Б

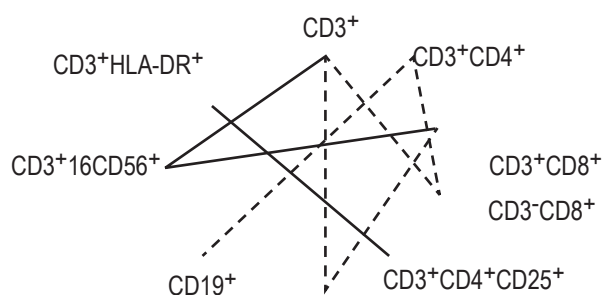


Рисунок 1. Характер взаимосвязи между субпопуляциями лимфоцитов у здоровых лиц (А) и больных ХРГИ (Б)

($p = 0,004$), а также снижение числа (%) $CD3^+CD16/56^+$ клеток ($p = 0,02$). В то же время значимых изменений количества Т- ($CD3^+$ клетки) и В-лимфоцитов ($CD19^+$), а также субпопуляции Т-цитотоксических клеток ($CD3^+CD8^+$), описываемых рядом авторов у больных ХРГИ тяжелого течения [2, 3, 6], не обнаруживалось.

Выявленное нами повышение количества $CD3^+CD4^+$ лимфоцитов в период клинической ремиссии заболевания может быть связано с персистенцией возбудителя в организме пациентов, что вызывает хроническое раздражение системы иммунитета и отражает нестабильность ремиссии.

Данные о снижении количества $CD3^+CD16/CD56^+$ лимфоцитов у больных ХРГИ согласуются с результатами ряда авторов [4, 6], и подтверждают важную роль натуральных киллеров в противовирусном иммунитете. В то же время по данным других исследователей при лабиальных и аногенитальных герпетических поражениях тяжелого течения в ремиссии заболевания наблюдалось даже увеличение количества NK-клеток по сравнению с группой доноров [8, 5].

Исследованиями последних лет показано, что оценка основных субпопуляций лимфоцитов при хронических воспалительных заболеваниях различной этиологии не обладает высокой клинической информативностью в связи с отсутствием четкой связи между сдвигами этих показателей и клиническим состоянием пациентов [9, 3]. Поэтому в настоящее время ведется поиск других, более информативных маркеров лимфоцитов, в частности, акцент переносится на так называемые «малые» субпопуляции и пулы активированных клеток [9]. Нами не было выявлено различий между больными ХРГИ и здоровыми лицами по содержанию в крови лимфоцитов с фенотипом $CD3^+CD56^+CD16^+$ и активированных клеток ($CD3^+CD4^+CD25^+$, $CD3^+HLA-DR^+$, $CD3^+HLA-DR^+$). В то же время у больных отмечалось более низкое относительное количество $CD3^+CD8^+$ лимфоцитов ($p = 0,008$). Пул клеток с данным фенотипом включает, по-видимому, преимущественно В лимфоциты и естественные киллеры, так как по данным литературы 30% NK-клеток являются $CD8^+$ [13]. Клиническое значение определения $CD3^+8^+$ лимфоцитов пока не известно, хотя имеются данные о снижении их количества при тяжелой неврологической патологии [7].

В целом анализ субпопуляционного состава лимфоцитов у больных с тяжелым течением

герпетической инфекции в ремиссии заболевания свидетельствует, что, вопреки ожиданиям, выраженных лабораторных признаков иммунодепрессии у этих пациентов не наблюдается. Количество натуральных киллеров ($CD3^+CD16/CD56^+$ лимфоциты), хотя и было сниженным по сравнению со значениями контрольной группы, тем не менее находилось на нижних значениях популяционной нормы (10,3–20,5%).

Отсутствие выраженных изменений в иммунограммах пациентов с ХРГИ может быть связано с клиническими особенностями заболевания у отдельных больных. В связи с этим мы проанализировали параметры иммунного статуса пациентов в зависимости от частоты рецидивирования. Пациентов разделили на 2 группы. Первую группу составили больные с количеством обострений от 6 до 9 раз в год, вторую – пациенты с непрерывно рецидивирующим процессом (10 и более обострений в год). Больные не различались по половозрастному составу и длительности анамнеза.

У больных обеих групп отмечались сдвиги субпопуляционного состава лимфоцитов, характерные для группы ХРГИ в целом: увеличение процентного содержания $CD3^+CD4^+$ лимфоцитов, снижение количества $CD3^+CD16/CD56^+$ и $CD3^+CD8^+$ лимфоцитов относительно здоровых лиц. При сравнительном анализе показателей иммунограмм у больных с непрерывно рецидивирующей герпетической инфекцией отмечалось более высокое содержание $CD3^+CD4^+CD25^+$ лимфоцитов ($p = 0,019$) и $CD3^+HLA-DR^+$ ($p = 0,034$), чем у пациентов 1 группы (табл. 1).

Как известно, молекула CD25 представляет собой α -цепь рецептора IL-2 и является маркером активации Т-лимфоцитов при воспалительных процессах различной этиологии [1, 9]. С другой стороны аналогичные фенотипические характеристики может иметь подкласс Т-лимфоцитов, обозначаемых как Treg, обладающий супрессорной активностью. Однако учитывая отсутствие других необходимых признаков Treg, а также описанную ниже корреляцию этих клеток с $CD3^+HLA-DR^+$, мы расценили повышение содержания $CD3^+CD4^+CD25^+$ клеток как свидетельство активно протекающих иммунных процессов. Индуктором этих процессов может служить вирус простого герпеса, который, согласно динамической теории патогенеза, регулярно реплицируется с образованием молодых вирионов [4]. В то же время не исклю-

ченны инерционные изменения в иммунной системе при смене обострения и межрецидивных периодов при тяжелом течении герпетической инфекции, которая характеризуется частыми рецидивами и отсутствием длительных и стойких ремиссий.

Выявленное нами повышение содержания клеток с фенотипом CD3-HLA-DR⁺ у больных с непрерывным рецидивированием ХРГИ также, вероятно, связано с большей антигенной нагрузкой на иммунную систему по сравнению с пациентами 1 группы (рецидивы до 9 раз в год), так как основную часть данного пула составляют Влимфоциты, являющиеся антигенпредставляющими клетками, и NK-клетки [10].

При анализе взаимосвязей между субпопуляциями лимфоцитов в контрольной группе выявлены 4 статистически значимые корреляции: CD3⁺лимфоциты (%) – NK-клетки ($r_s = -0,86$; $p < 0,001$); CD19⁺лимфоциты (%) – CD3⁺CD4⁺ ($r_s = -0,41$; $p = 0,03$); Т-цитотоксические (%) – NK-клетки ($r_s = -0,53$; $p < 0,001$); CD3⁺HLA-DR⁺ (%) – CD3⁺CD4⁺CD25⁺лимфоциты ($r_s = 0,67$; $p = 0,003$).

У больных ХРГИ в стадии ремиссии корреляции, характерные для здоровых лиц, сохранялись, причем имели такую же силу и направленность ($r_s = -0,69$, $p < 0,001$; $r_s = -0,44$, $p = 0,02$; $r_s = -0,46$, $p < 0,001$; $r_s = 0,64$, $p = 0,007$ соответственно). Кроме вышеперечисленных, обнаружены дополнительные корреляции: CD3⁺CD8⁺ (%) – с количеством CD3⁺CD16⁺CD56⁺ клеток ($r_s = 0,63$; $p = 0,002$) и CD3⁺лимфоцитов ($r_s = 0,50$; $p = 0,004$); а также CD3⁺CD8⁺ (%) – с количеством CD3⁺лимфоцитов ($r_s = -0,59$; $p < 0,001$) и Т-хелперов ($r_s = -0,48$; $p = 0,008$). Таким образом, у больных ХРГИ выявлено 8 корреляций между субпопуляциями лимфоцитов, что указывает на более высокую сопряженность между компонентами иммунной системы.

Нами обнаружена также четкая взаимосвязь частоты обострений заболевания с относительным количеством CD3⁺CD4⁺CD25⁺лимфоцитов ($r_s = 0,44$; $p = 0,01$) и CD3-HLA-DR⁺клеток ($r_s = 0,56$; $p = 0,002$), что является дополнительным подтверждением участия этих субпопуляций в обеспечении иммунного ответа в условиях непрерывной вирусной репродукции.

Заключение

У больных хронической рецидивирующей герпетической инфекцией тяжелого течения в стадии ремиссии признаков выраженной им-

мунодепрессии по содержанию основных и малых субпопуляций лимфоцитов не выявлено. Обнаружено более высокое содержание клеток с фенотипом CD3⁺CD4⁺CD25⁺ и CD3-HLA-DR⁺ в периферической крови пациентов с непрерывно рецидивирующим течением заболевания по сравнению с больными с меньшей частотой рецидивов. Выявлено наличие умеренной положительной взаимосвязи частоты обострений герпетической инфекции с относительным количеством CD3⁺CD4⁺CD25⁺ и CD3-HLA-DR⁺ лимфоцитов в периферической крови.

Список литературы

1. Воробьев, А.А., Быковская С.Н. Роль клеток-регуляторов CD4⁺25⁺ в развитии хронических инфекционных заболеваний // Вестник РАМН. – 2006. – № 9-10. – С. 24-29.
2. Дидковский, Н.А., Малашенкова И.К. Герпетическая инфекция тяжелого течения // Терапевтический архив. – 2007. – № 11. – С. 52-57.
3. Исаков, В.А., Рыбалкин С.Б., Романцов М.Г. Герпесвирусная инфекция // Рекомендации для врачей. – СПб., 2006. – С. 6-32.
4. Каримова И.Н. Герпесвирусная инфекция. Диагностика, клиника, лечение. – М.: Медицинское информационное агентство, 2004. – С. 44-72.
5. Кудин А.П., Германенко И.Г. Роль Herpes simplex в патологии человека. Часть I. Этиология, патогенез, состояние иммунитета // Медицинские новости. – 2004. – № 5. – С. 11-14.
6. Малышева О.А., Ширинский В.С. Состояние вегетативной нервной и иммунной систем у инфицированных вирусом простого герпеса // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2001. – № 3. – с. 37-40.
7. Мордовина Т.Г., Перковская А.Ф. Содержание аутоантител к белкам нервной ткани и субпопуляционный состав лимфоцитов у детей с тяжелой неврологической патологией // Аллергология и иммунология. – 2009. – Т. 10, № 2. – С. 279-280.
8. Полеско И.В., Бутов Ю.С. Иммунологический статус при простом герпесе // Российский медицинский журнал. – 2001. – № 6. – С. 37-38.
9. Хайдуков, С.В., Зурочка А.В. Основные и малые популяции лимфоцитов периферической крови человека и их нормативные значения (методом многоцветного цитометрического анализа) // Медицинская иммунология. – 2009. – Т. 11, № 2. – С. 227-238.

10. Хайдуков С.В. Многоцветный анализ проточной цитометрии для медико-биологических исследований: Дис. ...докт. биол. наук. — СПб, 2008

11. Chng W.J., Tan G.B., Kuperan P. Establishment of adult peripheral blood lymphocyte subset reference range for an Asian population by single-platform flow cytometry: influence of age, sex, and race and comparison with other published studies // Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology. — 2004. — Vol. 11, № 1. — P. 168-173.

12. Santagostino A., Garbaccio G., Pistorio A., Bolis V., Camisasca G., Pagliaro P., Girotto M. An Italian national multicenter study for the definition of a reference ranges for normal values of peripheral blood lymphocyte subsets in healthy adults // Haematologica. — 1999. — Vol. 84. — P. 499-504.

13. PathologyOutlines.com [Electronic resource]. — 2001-2009. — Mode of access: [http:// www.pathology-outlines.com/jobs.html](http://www.pathology-outlines.com/jobs.html). — Date of access: 31.03.2010.

поступила в редакцию 28.04.2010

отправлена на доработку 13.05.2010

принята к печати 14.05.2010