

ИЗМЕНЕНИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ И ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ В ДИНАМИКЕ ИНФЕКЦИОННОГО МОНОНУКЛЕОЗА, ВЫЗВАННОГО ВИРУСОМ ЭПШТЕЙНА–БАРР У ДЕТЕЙ

Куртасова Л.М., Голованова А.Е.

Красноярская государственная медицинская академия, г. Красноярск

Резюме. Проведены наблюдения за 69 детьми в возрасте 5-14 лет с инфекционным мононуклеозом, вызванным EBV в острую фазу заболевания и в период реконвалесценции. Изучены показатели клеточного и гуморального иммунитета, уровни спонтанной и митогениндуцированной продукции мононуклеарами периферической крови IL-2, IL-10, IFN γ . Установлена зависимость изменений исследуемых показателей от периода заболевания. При этом наиболее выраженные изменения обнаружены в острую фазу болезни. В период реконвалесценции наблюдается положительная динамика реакций клеточного и гуморального иммунитета. Однако полной нормализации большинства исследуемых иммунологических показателей и параметров цитокинового статуса не наступает, что соответствует клиническим проявлениям. Это обстоятельство свидетельствует о необходимости проведения в данный период заболевания иммунореабилитации.

Ключевые слова: иммунитет, цитокины, инфекционный мононуклеоз.

Kurtasova L.M., Golovanova A.E.

IMMUNOLOGICAL INDEXES AND CYTOKINE PROFILE IN THE CHILDREN DURING INFECTIOUS MONONUCLEOSIS CAUSED BY EPSTEIN-BARR VIRUS

Abstract. Sixty-nine children (5 to 14 years old) with infectious mononucleosis caused by EBV were observed in acute phase and during recovery period. The indexes under study did evaluate cell-mediated and humoral immunity, levels of spontaneous and mitogen-induced production of IL-2, IL-10, IFN γ by peripheral blood mononuclears. We have founded appropriate changes to be dependent on clinical phase of the disease. The most significant changes were revealed during acute phase of disease. A positive dynamics of cell-mediated and humoral immune response was observed during convalescence period. However, complete normalization of most immunologic indexes and cytokine status did not occur, corresponding to the clinical signs. This situation necessitates immune rehabilitation to be carried out for the children having at this phase of infectious mononucleosis. (*Med. Immunol.*, 2007, vol. 9, N 4-5, pp 541-545)

Адрес для переписки:

Куртасова Людмила Михайловна,
д.м.н., профессор кафедры клинической
иммунологии КрасГМА.
660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1.
Тел.: (3912) 27-24-13.
Факс: (3912) 22-16-38.
E-mail: aids@ktk.ru

Введение

Инфекционный мононуклеоз (ИМ) является одной из наиболее частых форм заболеваний, вызываемых вирусом Эпштейна–Барр (EBV). В последние годы отмечается рост заболеваемости ИМ, что обусловлено как истинным его увеличением, так и улучшением диагностики в связи с ассоциацией ИМ с ВИЧ-инфекцией [1, 3].

В настоящее время инфекционный мононуклеоз рассматривается как заболевание иммунной системы. Активная пролиферация вируса во всех органах, имеющих лимфоидную ткань, приводит к структурным изменениям, затрагивающим все звенья иммунной системы [1, 3]. Однако до сих пор не до конца расшифрованы механизмы иммунопатогенеза данного заболевания, а проблема иммунореабилитации по-прежнему остается одной из самых сложных, недостаточно изученных и важных.

Цель исследования — изучение показателей клеточного и гуморального иммунитета, оценка параметров цитокинового статуса в острую фазу заболевания и в период реконвалесценции ИМ у детей.

Материалы и методы

Проведены наблюдения за 69 детьми в возрасте от 5 до 14 лет с ИМ, вызванным EBV, со средней формой заболевания в острую фазу (2-5 день болезни) и в периоде реконвалесценции (3-4-я недели болезни) на базе городской детской инфекционной больницы № 1 и Краевого центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями г. Красноярска. Контрольную группу составили 33 практически здоровых ребенка аналогичного возрастного диапазона.

Диагноз ИМ верифицировали методом ПЦР с применением набора реагентов для выявления ДНК EBV в лимфоцитах крови фирмы «ДНК-технология» (Москва) и методом ИФА с использованием тест-систем фирмы «Human» (Германия) определяли IgM VCA, IgG EA-D, IgG NA-1 в сыворотке крови. Все больные имели положительный результат на ДНК EBV в лимфоцитах крови и серологические маркеры острой EBV-инфекции (EBV-VCA IgM, EBV-EA-D IgG).

Лимфоциты периферической крови выделяли в градиенте плотности фиколл-верографина [6]. Методом непрямой иммунофлуоресценции, используя FITC-меченные моноклональные антитела серии CD фирмы «DAKO», изучали содержание CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD25⁺, CD16⁺, CD19⁺ клеток. Концентрацию иммуноглобулинов классов А, М, G в сыворотке крови оценивали методом радиальной иммунодиффузии [9]. Содержание циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови определяли методом селективной преципитации [8].

В супернатантах, полученных от мононуклеарных клеток периферической крови ($1,0 \times 10^6$ кл/лунка), культивированных в течение 72 часов при 37°C в CO₂-инкубаторе, оценивали уровень спонтанной и стимулированной продукции IL-2, IL-10, IFN γ методом ИФА с помощью тест-системы

«CYTIMMUNE» (США). Для стимуляции использовали конканавалин А (Con A), 15 мкг/мл, «Sigma» (США).

Математическая обработка полученных данных проводилась методами описательной статистики с использованием пакета программ STATISTICA — V. 6.0.

Результаты и обсуждение

При анализе иммунологических показателей у больных в острый период ИМ на фоне повышенного содержания лейкоцитов периферической крови обнаружено выраженное увеличение относительного и абсолютного числа лимфоцитов по сравнению с параметрами контрольной группы (табл. 1). Изучение фенотипического спектра лимфоцитов крови показало повышение содержания зрелых Т-лимфоцитов (CD3⁺), CD8⁺ клеток, В-лимфоцитов (CD19⁺) как по относительным, так и по абсолютным показателям, значительное снижение процентного количества CD4⁺ клеток и увеличение абсолютного числа CD4⁺ и CD16⁺ лимфоцитов относительно контрольных значений (табл. 1). Нарушение процентного соотношения CD4⁺/CD8⁺ клеток приводило к резкому падению иммунорегуляторного индекса. Кроме того, в острый период ИМ отмечалось увеличение количества клеток, экспрессирующих активационный маркер CD25⁺ (табл. 1). Повышение числа лимфоцитов, несущих рецептор к IL-2 (CD25⁺), очевидно свидетельствует об активации иммунной системы и увеличении количества клеток, отвечающих на IL-2. Реакция гуморального звена иммунитета характеризовалась повышением всех изучаемых классов иммуноглобулинов (IgA, IgM, IgG) в сыворотке крови по сравнению с показателями контроля (табл. 2).

Результаты проведенного исследования установили, что в период реконвалесценции у детей с ИМ содержание лейкоцитов в периферической крови находится на уровне достоверно более низком, чем в остром периоде заболевания, и не имеет статистически значимых отличий от параметров контрольной группы (табл. 1). При этом процентное и абсолютное содержание лимфоцитов крови сохраняется повышенным относительно контрольных величин. Остается сниженным процентное количество CD4⁺ клеток по сравнению с показателями контрольной группы, однако их содержание достоверно выше, чем в острый период заболевания. Относительные и абсолютные показатели CD3⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов превышают параметры контроля. Уровень экспрессии Т-лимфоцитами активационного маркера (CD25⁺) почти в 2 раза ($p < 0,01$) снижается по сравнению с острой фазой болезни, в то же время статистически значимо превосходит

ТАБЛИЦА 1. ДИНАМИКА ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У ДЕТЕЙ С ИНФЕКЦИОННЫМ МОНОНУКЛЕОЗОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПЕРИОДА ЗАБОЛЕВАНИЯ ($M \pm m$)

Показатели	Контрольная группа (n = 33)	Больные инфекционным мононуклеозом		p1	p1	p3
		острый период (n = 69)	период реконвалесценции (n = 61)			
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	6,38 \pm 0,18	12,7 \pm 0,90	5,69 \pm 0,47	< 0,001		< 0,001
Лимфоциты, %	34,61 \pm 1,83	59,67 \pm 2,98	53,78 \pm 2,33	< 0,001	< 0,001	
Лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	2,25 \pm 0,14	5,74 \pm 0,63	3,10 \pm 0,39	< 0,001	< 0,001	< 0,001
CD3 ⁺ клетки, %	64,10 \pm 1,78	74,86 \pm 2,51	71,39 \pm 2,28	< 0,001	< 0,01	
CD3 ⁺ клетки, $\times 10^9/\text{л}$	1,45 \pm 0,10	4,31 \pm 0,61	2,23 \pm 0,31	< 0,001	< 0,01	< 0,05
CD4 ⁺ клетки, %	41,48 \pm 2,13	25,18 \pm 1,95	30,78 \pm 2,00	< 0,001	< 0,001	< 0,05
CD4 ⁺ клетки, $\times 10^9/\text{л}$	0,92 \pm 0,06	1,34 \pm 0,16	0,89 \pm 0,06	< 0,05		< 0,05
CD8 ⁺ клетки, %	19,03 \pm 1,57	42,45 \pm 3,95	35,22 \pm 2,81	< 0,001	< 0,001	
CD8 ⁺ клетки, $\times 10^9/\text{л}$	0,42 \pm 0,05	2,29 \pm 0,38	1,12 \pm 0,17	< 0,05	< 0,001	< 0,05
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	2,64 \pm 0,28	0,75 \pm 0,09	0,96 \pm 0,08	< 0,001	< 0,001	
CD25 ⁺ клетки, %	17,60 \pm 1,64	24,06 \pm 2,51	19,87 \pm 2,04	< 0,05		
CD25 ⁺ клетки, $\times 10^9/\text{л}$	0,36 \pm 0,02	1,22 \pm 0,16	0,62 \pm 0,07	< 0,001	< 0,001	< 0,001
CD16 ⁺ клетки, %	15,54 \pm 0,97	13,20 \pm 1,19	15,83 \pm 1,38			
CD16 ⁺ клетки, $\times 10^9/\text{л}$	0,36 \pm 0,02	0,60 \pm 0,07	0,56 \pm 0,09	< 0,001	< 0,05	
CD19 ⁺ клетки, %	16,05 \pm 1,38	23,12 \pm 1,24	17,02 \pm 0,80	< 0,001		< 0,001
CD19 ⁺ клетки, $\times 10^9/\text{л}$	0,42 \pm 0,04	0,62 \pm 0,04	0,48 \pm 0,03	< 0,05		< 0,05

Примечания. P1 – достоверность различий показателей острого периода и контрольной группы; P2 – достоверность различий показателей периода реконвалесценции и контрольной группы; P3 – достоверность различий показателей острого периода и периода реконвалесценции.

величины контрольной группы. Количество клеток, экспрессирующих антиген CD19, достоверно увеличенное в острую фазу болезни, в период реконвалесценции не имеет статистически значимых различий с параметрами контроля (табл. 1). Содержание IgM, IgG, IgA в сыворотке крови находится на уровне достоверно более высоком, чем в группе контроля. При этом концентрация IgM в 1,4 раза ($p < 0,05$) ниже, чем в острый период заболевания (табл. 2).

С целью оценки функциональной активности Th1- и Th2-клеток изучена продукция IL-2, IL-10 и IFN γ мононуклеарами периферической крови (МНПК). IL-2 является ключевым медиатором в развитии иммунных реакций и обладает широким спектром биологических эффектов, включая контроль и регуляцию пролиферации и дифференцировки лимфоцитов [4]. Полученные данные установили, что у детей с ИМ в острый период заболевания спонтанная про-

ТАБЛИЦА 2. УРОВНИ СЫВОРОТОЧНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ И ЦИК У ДЕТЕЙ С ИНФЕКЦИОННЫМ МОНОНУКЛЕОЗОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПЕРИОДА ЗАБОЛЕВАНИЯ ($M \pm m$)

Показатели	Контрольная группа (n = 33)	Больные инфекционным мононуклеозом		p1	p1	p3
		острый период (n = 69)	период реконвалесценции (n = 61)			
Ig A, г/л	1,14 \pm 0,11	2,65 \pm 0,23	2,25 \pm 0,26	< 0,001	< 0,001	
Ig M, г/л	0,93 \pm 0,08	1,99 \pm 0,15	1,43 \pm 0,12	< 0,05	< 0,001	< 0,05
Ig G, г/л	10,92 \pm 0,54	14,77 \pm 0,86	17,04 \pm 1,44	< 0,01	< 0,001	
ЦИК, о.е.	43,0 \pm 4,03	54,42 \pm 6,77	53,61 \pm 8,64			

Примечания: те же, что и для табл. 1.

ТАБЛИЦА 3. ДИНАМИКА ПАРАМЕТРОВ ЦИТОКИНОВОГО СТАТУСА У ДЕТЕЙ С ИНФЕКЦИОННЫМ МОНОНУКЛЕОЗОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПЕРИОДА ЗАБОЛЕВАНИЯ ($M \pm m$)

Показатели	Контрольная группа (n = 33)	Больные инфекционным моноклеозом		p1	p1	p3
		острый период (n = 12)	период реконвалесценции (n = 12)			
Спонтанная продукция						
IL-2, пг/мл	237,60±22,90	326,10±30,30	176,10±34,68	< 0,05		< 0,01
IL-10, пг/мл	2,46±0,22	6,15±1,33	7,25±1,64	< 0,05	< 0,05	
IFNγ, пг/мл	20,38±1,76	12,16±2,01	15,90±2,37	< 0,01		
Соп А-индуцированная продукция						
IL-2, пг/мл	601,20±59,60	372,89±41,20	313,40±52,45	< 0,01	< 0,01	
IL-10, пг/мл	17,01±1,69	10,69±3,26	12,92±2,08	0,1 > p > 0,05		
IFNγ, пг/мл	192,87±18,40	540,70±161,00	783,70±159,10	< 0,05	< 0,01	

Примечания: те же, что и для табл. 1.

дукция IL-2 МНПК достоверно выше, а Соп А-индуцированная продукция IL-2 резко снижена относительно показателей контрольной группы (табл. 3).

Важным иммунорегуляторным цитокином, контролирующим направление иммунного ответа, является IFN γ . Известно, что IFN γ усиливает экспрессию антигенов I и II классов главного комплекса гистосовместимости, подавляет активацию В-лимфоцитов, повышает цитотоксичность естественных киллеров, являющихся первой линией защиты против вирусных инфекций [2, 5]. Изучение способности МНПК к продукции IFN γ у больных ИМ в острый период выявило снижение в 1,7 раза ($p < 0,01$) уровня спонтанной и увеличение в 2,8 раза ($p < 0,05$) митоген-стимулированной выработки данного цитокина по отношению к величинам контроля (табл. 3).

В настоящее время установлено, что IL-10 обладает мощным противовоспалительным и иммуносупрессивным потенциалом и способен подавлять выработку «иммунорегуляторного» IFN γ , а также рост и дифференцировку Т-лимфоцитов [5, 7, 10]. Проведенный анализ показал, что в острый период ИМ спонтанная продукция IL-10 превышает показатели контрольной группы, а индуцированная имеет тенденцию к понижению (табл. 3).

В период реконвалесценции спонтанная продукция IL-2 МНПК в 1,9 раза ($p < 0,01$) ниже средних значений зарегистрированных в острый период болезни, уровень IL-10 остается повышенным, а показатели IFN γ не имеют достоверных различий в зависимости от периода заболевания. Продукция IL-2 супернатантами стимулированных клеток достоверно меньше, IFN γ в 4,1 раза ($p < 0,01$) выше по сравнению

с контрольными параметрами, а величины IL-10 статистически значимо не отличаются (табл. 3).

Таким образом, анализ цитокинового профиля в динамике ИМ показал, что в острый период преобладает Th1 тип иммунного ответа. В период реконвалесценции отмечается снижение продукции IL-2, показатели спонтанной продукции IFN γ приближаются к величинам контрольной группы, коэффициент соотношения уровней IFN γ /IL-10 (острый период $2,56 \pm 1,11$; период реконвалесценции — $3,25 \pm 2,224$) указывает на сохранение смещения цитокинового баланса в сторону Th1 типа, и практически не меняются относительно острой фазы заболевания параметры спонтанной и индуцированной продукции IL-10. Однако следует отметить, что в ходе развития иммунного ответа остается сниженной митоген-стимулированная продукция IL-2, в то время как индуцированная продукция IFN γ резко увеличена.

Заключение

Результаты проведенных исследований установили у детей с ИМ в острый период на фоне выраженного лимфоцитоза изменения иммунофенотипического спектра лимфоцитов, высокую интенсивность продукции гуморальных сывороточных факторов (IgA, IgM, IgG) и смещение цитокинового баланса в сторону медиаторов с провоспалительной и пролиферативной активностью. В период реконвалесценции отмечается положительная динамика реакций клеточного и гуморального иммунитета. Однако полной нормализации большинства исследуемых иммунологических показателей и параметров цитокинового статуса не наступает, что согласуется с клиническими данными.

Так, при осмотре больных на момент выписки из инфекционного стационара только 11 (15,94%) детей не имели клинических проявлений заболевания. У остальных больных (58 чел.) полного клинического выздоровления не отмечалось. При этом астеновегетативный синдром сохранялся у 84,05% (58 чел.) детей, увеличение размеров печени — у 71,01% (49 чел.), увеличение селезенки — у 18,84% (13 чел.). У 65,21% (45 чел.) больных оставались увеличенными шейные лимфатические узлы, и у 20,28% (14 чел.) сохранялась генерализованная лимфаденопатия. Следует отметить, что в течение первого месяца после выписки из инфекционного отделения 13 детей (18,84%) перенесли ОРВИ, 4 ребенка (5,79%) герпесвирусную инфекцию. У 5 детей (7,24%) наблюдался рецидив ИМ — на фоне фебрильной температуры вновь увеличились шейные группы лимфатических узлов, появилась заложенность носа, изменения в ротоглотке (распространенная гиперемия слизистой, гнойные наложения по лакунам миндалин), гепато- и спленомегалия. Это дает основание утверждать, что дети после перенесенного ИМ нуждаются в проведении иммуно-реабилитационных мероприятий.

Список литературы

1. Иванова В.В., Железникова Г.Ф., Аксенов О.А., Букина А.А. Инфекционный мононуклеоз: клиника, патогенез, новое в диагностике и терапии // *Инфекц. болезни*. — 2004. — № 4. — С. 5-12.
2. Носик Н.Н. Цитокины при вирусных инфекциях // *Вирусология*. — 2000. — № 1. — С. 4-9.
3. Помогаева А.П., Уразова О.И., Потарская Е.В., Файт Е.А., Перевозчикова Т.В. К патогенезу инфекционного мононуклеоза // *Инфекционные болезни*. — 2005. — Т. 3, № 4. — С. 35-38.
4. Симбирцев А.С. Интерлейкин-2 и рецепторный комплекс интерлейкина-2 в регуляции иммунитета // *Иммунология*. — 1998. — № 8. — С. 3-8.
5. Ярилин А.А. Система цитокинов и принципы ее функционирования в норме и при патологии // *Иммунология*. — 1997. — № 3. — С. 7-12.
6. Boyum A. Isolation of lymphocytes from blood and bone marrow // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* — 1968. — Vol. 97, N 21. — P. 77-80.
7. Fickenscher H., Hur S., Kopers H., Knappe A., Wittmann S., Sticht H. The interleukin-10 family of cytokines // *Trends Immunol.* — 2002. — Vol. 23, N 2. — P. 89-95.
8. Haskova V., Kaslik J., Riha J., Rovensky J. Simple method of circulating immune complex detection in human sera by polyethylene glycol precipitation // *J. Immunol.* — 1978. — N 154. — P. 399-406.
9. Manchini G., Carbonaro A.O., Haremans J.F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial diffusion // *Immunochemistry*. — 1965. — Vol. 2, N 1. — P. 235-255.
10. Ohga S., Nomura A., Takada H. Dominant expression of interleukin-10 and transforming growth factor-beta genes in activated T-cells of chronic active Epstein-Barr virus infection // *J. Med. Virol.* — 2004. — Vol. 74, N 3. — P. 449-458.

поступила в редакцию 09.02.2007

принята к печати 30.05.2007