

# ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОФЕНОТИПА ЛИМФОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С МИКСТ-ИНФЕКЦИЕЙ, ВЫЗВАННОЙ ВИРУСАМИ СЕМЕЙСТВА *HERPESVIRIDAE*

Долгих Т.И., Соколова Т.Ф., Минакова Е.Ю.

ГОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Центральная научно-исследовательская лаборатория Омской государственной медицинской академии, г. Омск

**Резюме.** В работе отражены специфические иммунологические изменения, характерные для микст-инфекции, вызванной вирусами семейства *Herpesviridae* в фазе активации: увеличение количества CD3<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> лимфоцитов, снижение уровня CD3<sup>+</sup>/CD95<sup>+</sup> клеток, увеличение количества натуральных киллеров, установление новых взаимосвязей между показателями системы иммунитета. Наличие ЦМВ или ВЭБ в составе микст-инфекции вносят особенности в изменение субпопуляционного состава лимфоцитов: для ассоциации ВПГ-1/2 и ЦМВ характерно повышение уровня активированных Т-лимфоцитов и Т-хелперов, ВПГ-1/2 и ВЭБ резкое снижение количества CD3<sup>+</sup>/CD95<sup>+</sup> лимфоцитов.

**Ключевые слова:** микст-инфекция, вирус герпеса 1 и 2 типов, цитомегаловирус, вирус Эпштейна–Барр, иммунокомпетентные клетки.

*Dolgikh T.I., Sokolova T.F., Minakova E.Y.*

## STUDIES OF LYMPHOCYTE SUBSETS IN PATIENTS WITH A MIXED INFECTION CAUSED BY THE VIRUSES FROM *HERPESVIRIDAE* FAMILY

**Abstract.** Present work deals with specific immunologic changes that are typical to various types of mixed infection caused by viruses from *Herpesviridae* family during their activation phase. These changes include increased amounts of CD3<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> lymphocytes and CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> cells, decreased levels of CD3<sup>+</sup>/CD95<sup>+</sup> cells, increased contents of natural killer cells, altered interrelations between the immune system parameters. Involvement of cytomegalovirus or Epstein-Barr virus (EBV) in the mixed infection is associated with some special changes of the lymphocyte subsets. I.e., a co-infection with herpes virus simplex (HSV) type 1/2 and cytomegalovirus is characterized by increased amounts of activated T-lymphocytes and T-helper cells, whereas mixed HSV/EBV infection is accompanied by sharp reduction in CD3<sup>+</sup>/CD95<sup>+</sup> lymphocytes. (*Med. Immunol.*, vol. 12, N 3, pp 433-436)

**Keywords:** mixed infection, herpes simplex virus type 1 (HSV-1), herpes simplex virus type 2 (HSV-2), cytomegalovirus, Epstein–Barr virus, immunocompetent cells.

## Введение

На фоне высокого уровня инфицированности вирусами семейства *Herpesviridae* заболеваемость

человечества герпесвирусными инфекциями из года в год нарастает, опережая скорость прироста населения Земли. Проблема герпесвирусной инфекции приобретает медико-социальный характер, а многообразие клинических проявлений, особенности возбудителей, возможность их распространения практически всеми известными путями передачи позволили Европейскому региональному бюро ВОЗ отнести герпесвирусные инфекции в группу болезней, которые

### Адрес для переписки:

Долгих Татьяна Ивановна,  
644001, ул. 20 лет РККА, 15.  
Тел.: (3812) 37-03-43.  
Факс: (3812) 36-17-90.  
E-mail: dolgih-ti@mail.ru

определяют будущее инфекционной патологии в текущем столетии [2, 6].

Длительная персистенция вирусов на фоне вторичного иммунодефицита и их реактивация, сопровождающаяся нередко рецидивами заболевания и нарастанием клинических проявлений, являются одной из проблем современной медицины. Известно, что ведущая роль в формировании противовирусного иммунитета принадлежит клеточным механизмам защиты при их взаимодействии с гуморальными факторами [1, 5]. Именно состояние Т-клеточного звена, играющего ключевую роль в формировании противогерпетического иммунитета, и эффективность межклеточного взаимодействия во многом определяют частоту, степень выраженности и продолжительность рецидивов инфекции [4]. Качество иммунного ответа непосредственно связано с активностью различных субпопуляций иммунокомпетентных клеток, а их определение позволит проводить оценку способности иммунной системы отвечать на антигенную стимуляцию [8].

Персистенция вирусов затрагивает практически все факторы противовирусного иммунитета [3]. Для инфекции, вызванной вирусами семейства *Herpesviridae*, характерным является переход вируса в латентную фазу. Вирусный антиген перестает экспрессироваться на поверхности клеток, и патоген становится недостижимым для иммунных факторов. Частота активации вируса зависит от резистентности и иммунологической реактивности организма человека [7]. В период репликации вируса происходит активация иммунокомпетентных клеток. Вместе с тем, в настоящее время до конца не изучен иммунопатогенез герпесвирусных инфекций.

Цель исследования — изучить фенотип лимфоцитов у пациентов с герпесвирусной микст-инфекцией.

## Материалы и методы

В исследование было включено 22 женщины и 10 мужчин с хронической инфекцией, вызванной вирусами герпеса 1 и 2 типов (ВПГ-1/2) в сочетании с цитомегаловирусом (ЦМВ) или вирусом Эпштейна—Барр (ВЭБ). Средний возраст составил  $31,9 \pm 12,2$  лет. Длительность заболевания колебалась от 1 года до 14 лет, средняя длительность заболевания составила  $6,1 \pm 3,6$ . У всех пациентов имела место вирусная микст-инфекция в фазе активации вируса, доказанной с использованием комплекса прямых (полимеразная цепная реакция, реакция иммунофлюоресценции) и непрямых (иммуноферментный анализ, иммуно-блот) лабораторных методов. Преимущественно наблюдалось сочетание инфекций, вызванных ВПГ-1/2 и ЦМВ — в 24 случаях (75%), ВПГ-1/2 и ВЭБ — в 8 случаях (25%). В дальнейшем для оценки влияния микст-инфекции на формирование иммунного ответа все пациенты, включенные в исследование, были разделены на две груп-

пы. В IА группу вошли пациенты с герпетической инфекцией, сочетающейся с ЦМВ-инфекцией, в IБ группу — пациенты с герпетической инфекцией в сочетании с ВЭБ — инфекцией. II группу (контроль) составили 40 практически здоровых людей, сопоставимых по возрасту и полу.

Показатели общего анализа крови оценивали в автоматическом режиме на гематологическом анализаторе «EXCELL-22». Определение субпопуляций лимфоцитов по маркерам клеточной дифференцировки ( $CD3^+$ ,  $CD3^+/CD4^+$ ,  $CD3^+/CD8^+$ ,  $CD20^+/CD19^+$ ,  $CD16^+/CD56^+$ ,  $CD3-CD16^+/CD56^+$ ,  $CD3^+CD16^+/CD56^+$ ,  $CD3^+/CD25^+$ ,  $CD3^+/CD95^+$ ,  $CD19^+/CD5^+$ ,  $CD4^+/CD25^+$ ,  $CD3^+/CD50^+$ ,  $CD14^+HLA-DR^+$ ) проводили методом проточной цитометрии (цитофлюориметр проточный «Cytomics FC-500») с использованием коммерческих реагентов производства компании «Beckman Coulter» (США).

Для статистической обработки данных использовали пакет прикладных программ «Statistica-6,0» для Windows. Нормальность распределения показателей определяли с помощью одновыборочного критерия Колмогорова—Смирнова. Полученные данные представлены в виде среднего арифметического и стандартного отклонения (при нормальном распределении) или с указанием медианы (Me) и верхнего (P75) и нижнего квартилей (P25) (при распределении, отличном от нормального). Проведение определения нормальности распределения обосновало дальнейшую необходимость использования непараметрических методов статистической обработки. Для сравнения двух групп использовали U-критерий Манна—Уитни. Результаты считались значимыми при  $p < 0,05$ . Корреляционный анализ проводили с использованием г-коэффициента Спирмена.

## Результаты и обсуждение

Анализ клинических данных показал наличие у пациентов следующих клинических проявлений: лабиальный герпес (41%), генитальный герпес (23%), офтальмогерпес (33%), сиаладенит (37%), лимфаденопатия (83%) и субфебрилитет (78%). У включенных в исследование больных герпетическая инфекция протекала в виде легкой и среднетяжелой формы с частотой рецидивирования от 4 до 8 раз в год (в среднем  $6,2 \pm 1,5$  раз в год).

Результаты сравнительного исследования относительного содержания субпопуляций иммунокомпетентных клеток у обследованных пациентов в сравнении с контролем представлены в таблице 1. У больных с герпесвирусными инфекциями было выявлено высокое содержание  $CD3^+$  лимфоцитов, при этом имело место статистически значимое повышение процентного числа  $CD4^+$  клеток по сравнению с соответствующими показателями у здоровых доноров. В тоже время количество лимфоцитов с цитотоксической активностью ( $CD8^+$ ) и В-клеток ( $CD20^+$ )

не отличалось от показателей в контрольной группе. Показано достоверное увеличение процентного содержания исследуемых субпопуляций NK-клеток ( $CD16^+/CD56^+$ ,  $CD3^+CD16^+/CD56^+$ ) и увеличение числа маркера ранней активации Т-лимфоцитов —  $CD3^+/CD25^+$  на фоне уменьшения  $CD3^+/CD95^+$  Т-клеток. При сравнительном анализе количества  $CD4^+/CD25^+$  достоверных различий не установлено.

Полученные нами данные свидетельствуют об активации  $CD3^+$ ,  $CD4^+$  лимфоцитов у пациентов с микст-инфекцией, вызванной вирусами семейства *Herpesviridae*, что может быть обусловлено высоким уровнем репликации вируса. Проведение корреляционного анализа установило наличие положительной связи содержания  $CD3^+/CD4^+$  с процентным содержанием  $CD3^+/CD50^+$  ( $r = 0,56$ ,  $p = 0,02$ ), а также уменьшение содержания  $CD3^+/CD95^+$  Т-клеток, что свидетельствует о нарушении процессов индукции апоптоза лимфоцитов в условиях выраженной стимуляции иммунной системы.

На данном этапе обследования мы не получили отличий процентного числа  $CD3^+/CD50^+$  (ICAM-3) и  $CD19^+/CD5^+$  от контрольных значений. Но следует отметить, что результаты проведенного исследования позволили выявить положительную корреляционную связь средней силы между процентным содержанием лимфоцитов и  $CD19^+/CD5^+$  ( $r = 0,52$ ,  $p = 0,05$ ), а также  $CD20^+/CD19^+$  и  $CD19^+/CD5^+$  ( $r = 0,57$ ,  $p = 0,03$ ). В тоже время наблюдалась отрицательная корреляция между возрастом и процентным содержанием  $CD19^+/CD5^+$  ( $r = -0,59$ ,  $p = 0,02$ ). Так, с увеличением возраста пациентов отмечалось более низкое содержание  $CD19^+/CD5^+$ . Интересен и тот факт, что у пациентов с микст-инфекцией, вызванной вирусами семейства *Herpesviridae*, снижение количества моноцитов и повышение уровня  $CD3^+/CD50^+$  коррелировали между собой ( $r = -0,51$ ,  $p = 0,04$ ). Отмече-

на тенденция к снижению по сравнению с контрольными значениями процентного содержания  $CD14^+HLA-DR^+$ , являющимся одним из основных маркеров миелоидных клеток. Снижение экспрессии  $CD14$  сопровождалось повышением экспрессии  $CD16$  с последующим приобретением моноцитами свойств тканевых макрофагов с выраженной провоспалительной активностью, что является характерным в фазу репликации вируса. Процентное содержание  $CD14^+HLA-DR^+$  отчетливо коррелировало с количеством лимфоцитов ( $r = 0,54$ ,  $p = 0,05$ ), моноцитов ( $r = 0,56$ ,  $p = 0,04$ ), а также с уровнем  $CD3^+CD16^+/56^+$  ( $r = 0,54$ ,  $p = 0,05$ ).

Сравнительный анализ результатов иммунофенотипирования крови пациентов с микст-инфекцией показал (табл. 2), что в случае сочетания ВПГ-1/2 с ЦМВ (IA группа) было выявлено статистически значимое повышение процентного числа  $CD4^+$  клеток в IA группе по сравнению с соответствующими показателями у здоровых доноров, в то время как при сочетании ВПГ-1/2 с ВЭБ (IB группа) различий с показателями контроля не установлено, но имеется тенденция к повышению процентного содержания исследуемых субпопуляций NK-клеток ( $CD16^+/CD56^+$ ,  $CD3^+CD16^+/CD56^+$ ). Количество активированных Т-лимфоцитов, несущих на своей поверхности ранний маркер активации  $CD25^+$ , в IA группе в 2,3 раза превышало аналогичный показатель в IB группе. При этом в IB группе отмечено резкое снижение  $CD3^+/CD95^+$  — (в 3 раза по сравнению со значениями в IA группе и в 5,7 раза по сравнению с контрольными значениями). По уровню  $CD19^+/CD5^+$  достоверных различий в группах не получено, однако процентное содержание  $CD3^+/CD50^+$  в обеих подгруппах имело тенденцию к повышению, причем это было более характерно при сочетании ВПГ-1/2 с ЦМВ. Процентное содержание моноцитов IB группы прак-

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОГО СТАТУСА У ПАЦИЕНТОВ С ГЕРПЕСВИРУСНОЙ МИКСТ-ИНФЕКЦИЕЙ, Me (P25; P75)

Показатели	Группа с микст-инфекцией n = 32	Контрольная группа n = 40
$CD3^+$ , %	74,0 (63,6; 77,7)	67,3 (59,6; 73,4)
$CD3^+/CD4^+$ , %	43,3 (36,7; 53,3)*	35,5 (29,3; 43,8)
$CD3^+/CD8^+$ , %	25,0 (20,4; 28,5)	23,7 (17,5; 28,3)
$CD3^+/CD25^+$ , %	1,0 (0,7; 1,6)*	0,3 (0,2; 0,3)
$CD3^+/CD95^+$ , %	0,8 (0,4; 1,9)*	2,3 (2,2; 2,5)
$CD3^+/CD50^+$ , %	74,2 (67,5; 78,4)	74,8 (67,1; 79,3)
$CD4^+/CD25^+$ , %	4,2 (3,2; 5,1)	3,5 (2,9; 4,3)
$CD20^+/CD19^+$ , %	8,4 (6,7; 11,3)	9,3 (8,8; 9,9)
$CD19^+/CD5^+$ , %	1,1 (0,4; 1,7)	1,6 (0,7; 2,1)
$CD16^+/CD56^+$ , %	18,9 (13,4; 22,8)*	12,2 (11,6; 13,0)
$CD3^+CD16^+/56^+$ , %	2,0 (1,2; 3,6)	2,2 (1,1; 3,8)
$CD3^+CD16^+/56^+$ , %	16,5 (11,4; 18,1)*	9,2 (8,3; 10,1)
$CD14^+HLA-DR^+$ , %	77,3 (66,7; 96,2)	87,5 (56,3; 99,4)

Примечание. \* – достоверность различий по отношению к контролю ( $p < 0,05$ ).

ТАБЛИЦА 2. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК У ПАЦИЕНТОВ С ГЕРПЕСВИРУСНОЙ МИКСТ-ИНФЕКЦИЕЙ, Me (P25; P75)

Показатели	IA группа, n = 24	IB группа, n = 8
Лимфоциты, %	33,8 (30,0; 39,0)	29,0 (25,0; 36,0)
CD3 <sup>+</sup> , %	74,2 (63,5; 77,5)	74,0 (63,6; 78,5)
CD3 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> , %	46,9 (35,8; 56,0) <sup>^</sup>	40,7 (36,8; 44,7)
CD3 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> , %	24,2 (21,0; 27,9)	25,4 (17,3; 33,9)
CD3 <sup>+</sup> /CD25 <sup>+</sup> , %	1,4 (0,8; 2,0)*	0,6 (0,2; 1,3)
CD3 <sup>+</sup> /CD95 <sup>+</sup> , %	1,3 (0,6; 1,9)	0,4 (0,3; 0,8) <sup>^</sup>
CD3 <sup>+</sup> /CD50 <sup>+</sup> , %	75,1 (67,5; 79,9)	70,4 (65,0; 77,3)
CD4 <sup>+</sup> /CD25 <sup>+</sup> , %	3,2 (1,3; 4,2)	4,7 (3,8; 5,6)
CD20 <sup>+</sup> /CD19 <sup>+</sup> , %	8,7 (7,0; 11,8)	8,0 (4,7; 11,3)
CD19 <sup>+</sup> /CD5 <sup>+</sup> , %	1,1 (0,6; 1,7)	0,9 (0,1; 1,6)
CD16 <sup>+</sup> /CD56 <sup>+</sup> , %	18,7 (13,3; 19,3)	22,5 (13,5; 23,6)
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> /56 <sup>+</sup> , %	13,2 (11,3; 16,9)	19,6 (11,4; 21,3)
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> /56 <sup>+</sup> , %	2,1 (1,3; 4,0)	1,5 (1,2; 2,4)
Моноциты, %	5,9 (4,0; 8,0)	9,0 (5,0; 10,0)
CD14 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> , %	77,3 (60,8; 96,2)	77,4 (69,2; 93,8)

**Примечание.** \* – достоверность различий по отношению к показателям IB группы ( $p < 0,05$ ), ^ – достоверность различий по отношению к контролю ( $p < 0,05$ ).

тически в 2 раза больше уровня IA группы, при этом количество CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> не отличалось.

Таким образом, активация герпесвирусной инфекции вызывает изменения иммунофенотипа лимфоцитов: увеличение количества активированных Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>) и Т-хелперов (CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>), снижение уровня Т-лимфоцитов, несущих маркеры апоптоза (CD3<sup>+</sup>/CD95<sup>+</sup>). Изменение фенотипа Т-лимфоцитов сопровождается увеличением количества натуральных киллеров (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>/56<sup>+</sup>). Наличие инфекции способствует установлению новых взаимосвязей между показателями системы иммунитета: положительной корреляционной связи между содержанием в крови Т-хелперов (CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>) и клеток, несущих на своей поверхности молекулы адгезии (CD3<sup>+</sup>/CD50<sup>+</sup>), отрицательной взаимосвязи CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> клеток и Т-лимфоцитов, несущих маркеры апоптоза (CD3<sup>+</sup>/CD95<sup>+</sup>), прямых корреляционных связей между уровнем В1-клеток, продуцирующих IgM-аутоантитела, и общим количеством лимфоцитов и В-лимфоцитов. Содержание CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> клеток коррелировало с количеством лимфоцитов, моноцитов, а также с уровнем CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>/56<sup>+</sup> лимфоцитов. Наличие ЦМВ или ВЭБ в составе микст-инфекции вносят особенности в изменение субпопуляционного состава лимфоцитов: для ассоциации ВПГ-1/2 и ЦМВ характерно повышение уровня активированных Т-лимфоцитов и Т-хелперов, ВПГ-1/2 и ВЭБ – резкое снижение количества CD3<sup>+</sup>/CD95<sup>+</sup> лимфоцитов.

## Список литературы

1. Бахов Н.И., Барсуков А.А., Земсков В.М. Клеточные системы защиты организма от вирус-

ной инфекции: внутриклеточные механизмы защиты // Успехи современной биологии. – 2003. – Т. 123, № 2. – С. 161-174.

2. Железникова Г.Ф. Инфекция и иммунитет: стратегия обеих сторон // Медицинская иммунология. – 2006. – Т. 8, № 5-6. – С. 597-614.

3. Наследникова И.О., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Ткаченко С.Б., Зима А.П. Дисбаланс иммунорегуляторных Th1- и Th2-цитокинов при персистентных вирусных инфекциях // Медицинская иммунология. – 2007. – № 1. – С. 53-60.

4. Полеско И.В., Бутов Ю.С., Малиновская В.В., Халдин А.А. Иммунологический статус при простом герпесе // Российский медицинский журнал. – 2001. – № 6. – С. 37-38.

5. Порядин Г.В., Салмаси Ж.М., Казимирский А.Н. Активационные маркеры лимфоцитов как показатели дисрегуляции иммунной системы при воспалении // Патологическая физиология и экспериментальная медицина. – 2006. – № 1. – С. 2-8.

6. Сухих Г.Т., Ванько Л.В., Кулаков В.И. Иммунология и генитальный герпес. – Н.-Новгород: Изд-во НГМА, 1997. – 224 с.

7. Jones C.A., Fernandez, Herc M.K., Bosnjak L., Miranda-Saksena M., Boadle R.A., Cunningham A. Herpes simplex virus Type 2 induces rapid cell death and functional impairment of murine dendritic cells in vitro // J. Virology. – 2003. – Vol. 77, N 20. – P. 11139-11149.

8. Lundberg P., Welander P., Han Herpes simplex virus type 1 DNA is immunostimulatory in vitro and in vivo // J. Virology. – 2003. – Vol. 77, N 20. – P. 11158-11169.

поступила в редакцию 24.12.2009

отправлена на доработку 28.01.2010

принята к печати 27.02.2010