

УДК 616.523: 577.254

DOI: 10.26565/2617-409X-2018-1-12

ОСОБЕННОСТИ ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ ЭПШТЕЙНА-БАРР ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

М. М. Попов, Т. И. Лядова, О. Г. Сорокина.

Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, г. Харьков, Украина

В работе представлены результаты исследования уровней основных регуляторных цитокинов у пациентов с различными формами Эпштейна-Барр вирусной инфекции. Анализ динамики цитокинового профиля у больных с Эпштейна-Барр вирусной инфекции позволил выявить разнонаправленные изменения синтеза исследуемых провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, что являлось основанием для установления четырех типов иммунного реагирования. Полученные данные подтверждают существование цитокинового дисбаланса при Эпштейна-Барр вирусной инфекции. Установленные типы иммунного реагирования свидетельствуют о неадекватной клеточно-гуморальной реактивности организма в условиях длительной персистенции Эпштейна-Барр вирусной инфекции, что проявляется склонностью к подавлению клеточно-опосредованных и усилением гуморальных механизмов иммунного ответа и отображается в клинико-биохимических проявлениях болезни, а также приводит к затяжному волнообразному течению.

Ключевые слова: иммунитет, цитокины, типы иммунного реагирования, ВЭБ-инфекция.

Введение.

Актуальность Эпштейна-Барр вирусной инфекции (ВЭБ) обусловлена высокой степенью инфицирования населения, поскольку специфические антитела к ВЭБ выявляются почти у 95% взрослого населения. Специфическая тропность ВЭБ к иммунокомпетентным клеткам, системное поражение внутренних органов, широкий диапазон клинических форм заболевания, а также отсутствие специфической профилактики является предметом исследования многих ученых [1, 2]. На сегодняшний день инфекционный мононуклеоз (ИМ) рассматривается как заболевание иммунной системы. Пролиферативная активность вируса в лимфоидных органах приводит к структурным изменениям, которые затрагивают все звенья иммунной системы, нарушения которых имеют комбинированный характер и касаются как клеточного, так и гуморального звена что, по всей вероятности, является причиной длительного течения болезни и пожизненной персистенции вируса [2, 3, 4].

Манифестные формы ИМ обычно клинически проявляются триадой симптомов: лихорадкой, лимфаденопатией, тонзиллитом, однако в клинической практике описаны формы ИМ, связанные с поражением сердца: мио-, эндо- либо перикардиты; центральной и периферической нервной системы: менингиты, менингоэнцефалиты, моно- или полирадикулоневриты; почек: нефриты; железистых органов: панкреатиты или орхиты и др. [4, 5, 6]

Кроме того, описано множество клинических форм ВЭБ (опухолевых и неопухолевых), при которых вирус играет роль этиологического фактора [2].

Установлено, что ВЭБ обладает большим набором генов, дающим ему возможность в определенной мере ускользать от иммунной системы человека. В частности, ВЭБ вырабатывает белки – аналоги ряда человеческих интерлейкинов и их рецепторов, изменяющих иммунный ответ [9, 10]. В период активного размножения вирус продуцирует ИЛ-10-подобный белок, который подавляет Т-клеточный иммунитет, функцию цитотоксических лимфоцитов, макрофагов, нарушает все этапы функционирования естественных киллеров. Другой вирусный белок может блокировать активность клеток-киллеров путем ингибирования интерлейкина-12.

Кроме того, ВЭБ обладает высокой мутабельностью, что позволяет ему на определенное время избегать воздействия специфических иммуноглобулинов (которые были наработаны к вирусу до его мутации) и клеток иммунной системы хозяина. Таким образом, размножение ВЭБ в организме человека может явиться причиной возникновения вторичного иммунодефицита [11-13].

Прогнозирование исходов ВЭБ-инфекции, зависит от наличия и степени выраженности иммунной дисфункции, генетической предрасположенности к тем или иным ВЭБ-ассоциированным заболеваниям, а также от наличия ряда внешних факторов (стрессы, инфекции, операционные вмешательства, неблагоприятное воздействие окружающей среды), повреждающих иммунную систему. Нарушение баланса между основными регуляторными цитокинами, безусловно, может приводить к длительной персистенции ВЭБ, частым рецидивам и прогрессированию заболевания. С этих позиций, ВЭБ-инфекцию можно рассматривать как «несбалансированную цитокинемию» [3, 4, 5, 6]. По научным данным установлено, что преобладающее участие цитокинов, продуцируемых Th-2-лимфоцитами, ассоциируется с длительной вирусной персистенцией и хронизацией процесса, тогда как активация Th-1 типа – со спонтанным выздоровлением при острых формах ВЭБ [6, 7, 8]. Поэтому, изучение данных о продукции основных регуляторных цитокинов с установлением типов иммунологического реагирования при ВЭБ-инфекции является актуальными.

Цель исследования: установить типы иммунного реагирования для прогнозирования клинического течения заболевания у больных с различными формами ВЭБ-инфекции на основании анализа динамики продукции цитокинов (ИЛ-1 β , ФНО- α , ИЛ-6, ИЛ-2, ИЛ-4 и ИЛ-10)

Материалы и методы.

Работа выполнена на кафедре общей и клинической иммунологии и аллергологии медицинского факультета Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина и клинических базах кафедры Областной клинической инфекционной больницы г. Харькова и КУОЗ «Городская поликлиника №6» г. Харькова в 2009-2015 гг. в рамках научно-исследовательской темы: «Изучение роли иммунных, аутоиммунных и метаболических нарушений в патогенезе и исходах инфекционного процесса, вызванного герпесвирусами» (№ государственной регистрации №0112U005911).

Для выполнения поставленной цели нами был обследован 321 пациент с ВЭБ-инфекцией. Возраст обследованных пациентов находился в диапазоне от 19 до 57 лет (средний возраст $33,1 \pm 11,7$ лет). Женщины составляли 57,6% (n=185), мужчины – 42,4% (n=136) (соотношение женщины-мужчины 1,2:1,0). Среди обследованных больных ИМ и хронической ВЭБ-инфекции (ХВЭБ) преобладали лица женского пола (57,6 и 62% соответственно), средний возраст составил ($24,5 \pm 2,2$ и $33,8 \pm 3,1$ года, соответственно).

Все пациенты с клиническим статусом были условно разделены на следующие группы. Первая группа состояла из лиц с ИМ (n=138), в которую вошли пациенты с лабораторно доказанными признаками первичной вирусной инфекции. Верификация клинического диагноза

ИМ проводилась в соответствии с рекомендациями Ж.И. Возиановой и соавт. (2001). Во вторую группу были включены пациенты с различными формами хронической ВЭБ-инфекции (ХВЭБ) (n=183), среди которых: серозный менингит (n=8), хронический тонзиллит (n=32), неспецифическая лимфаденопатия (n=48), длительный субфебрилитет (n=54), реактивный артрит (n=16), синдром хронической усталости (n=25).

Группа сравнения состояла из 20 клинически здоровых молодых людей без признаков острой или любой хронической патологии, из которых 16 были обследованы на маркеры ВЭБ средний возраст $24,1 \pm 3,2$ лет. В анамнезе жизни отсутствовали данные о перенесенном ИМ, а «серологический профиль» характеризовался наличием в крови только EBNA - Ig G к нуклеарным антигенам и отсутствием ДНК ВЭБ в плазме крови и слюне. Всем больным ИМ или лимфаденопатией обязательно проводили бактериологическое исследование мазков из носоглотки на патогенную микрофлору и дифтерию.

В комплекс обследования больных входили клинический анализ крови, выявление наличия атипичных мононуклеаров, выявление специфических противовирусных антител (VCA-IgM, EA-IgM и EBNA-IgG) в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа (тИФА) наборами производства «IBL» (Германия) и «Вектор-Бест» (РФ), выявление ДНК ВЭБ методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в крови и слюне, активность аспарагиновой и аланиновой трансаминаз (АсАТ, АлАТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и креатинфосфаткиназы (КФК), фибриногена в динамике заболевания.

Для подтверждения диагноза как скрининговый экспресс-анализ крови на наличие ВЭБ применяли гетерофильный тест в модификации Гоффа-Бауэра (ГБ) (Чирешкина Н.М., 1973). У части пациентов для дифференциальной диагностики проводили серологические обследования на вирус простого герпеса 1 + 2 типа (ВПГ-1 + 2), цитомегаловирус (ЦМВ), токсоплазму, вирусы гепатитов (А, В и С), ВИЧ. Для этого использовали соответственно следующие тест-системы для тИФА: анти-ЦМВ-IgM, анти-Токсо-IgM, анти-ВГА-IgM, HBsAg, анти-HBc-total и анти-ВИЧ-1+2 total производства: НПО «Диапроф» (Украина), «Диагностические системы» (РФ), «Вектор-Бест» (РФ), «IBL» (Германия).

Молекулярно-генетические исследования включали определение репликативной активности ВЭБ на основании обнаружения в сыворотке крови ДНК ВЭБ методом ПЦР с помощью тест-систем производства НПФ "Литех" (Россия).

Сывороточные концентрации исследуемых цитокинов: ИЛ-1 β , ФНО- α , ИЛ-6, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10 определялись с помощью тест-систем ООО «Протеиновый контур» (Санкт-Петербург, Россия), пользуясь инструкцией производителя с использованием тИФА. Материалом для исследований была сыворотка крови больных ХВЭБ, которая была получена в периоде обострения болезни.

Техническое исполнение анализов проводилось в клиничко-диагностической лаборатории областной клинической инфекционной больницы г. Харькова (ОКИБ), медицинской лаборатории «СИНЕВО».

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием программы Statistika 6.0 for Windows (Stat Soft Inc, США) на персональном компьютере с процессором Pentium II Celeron 850 PPGA. Данные результатов, полученных при обследовании этой категории больных, представлены в статье в виде абсолютных значений.

Уровни продукции провоспалительных (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО- α), противовоспалительных (ИЛ-4, ИЛ-10) и регуляторный (ИЛ-2) были изучены у 40 больных с ИМ и 40 с ХВЭБ инфекцией.

Результаты и обсуждения

Анализируя динамику цитокинового профиля у больных с ИМ нами были выявлены разнонаправленные изменения синтеза исследуемых провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, что являлось основанием для установления четырех типов иммунного реагирования: I – нормореактивный тип (достоверное повышение провоспалительных и противовоспалительных цитокинов), II – диссоциативный (высокие показатели провоспалительных цитокинов на фоне низких значений регуляторного ИЛ-2 и противовоспалительных цитокинов), III – гипореактивный (низкие концентрации как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов) и IV – гиперреактивный (высокие концентрации как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов).

Данные о выявленных типах иммунного реагирования представлены ниже.

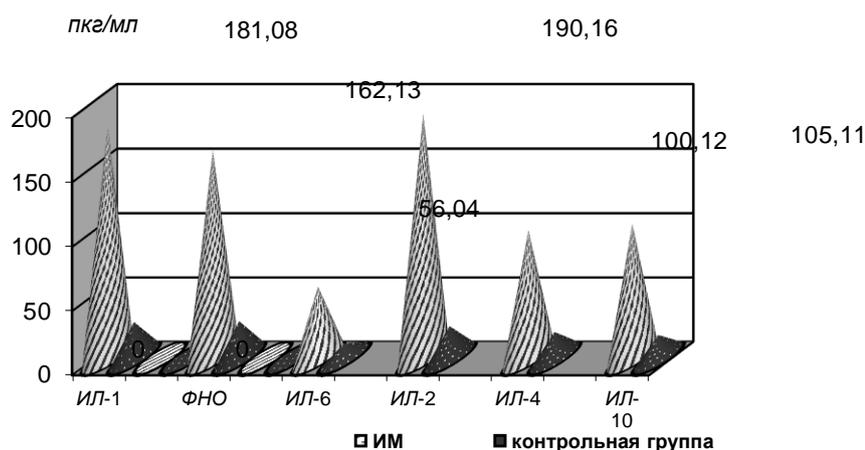


Рис. 1. Нормореактивный тип иммунного реагирования у пациентов с ИМ.

Анализ данных продукции провоспалительных (ИЛ-1β, ФНО-α, ИЛ-6), регуляторного (ИЛ-2) и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-10) у больных ИМ при нормореактивном типе иммунного ответа (рис. 1) позволил выявить достоверные увеличение всех исследуемых показателей в среднем в 5,2-7,7 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контрольными уровнями. Данный тип иммунного реагирования был выявлен у 17 пациентов (42,5%) с ИМ.

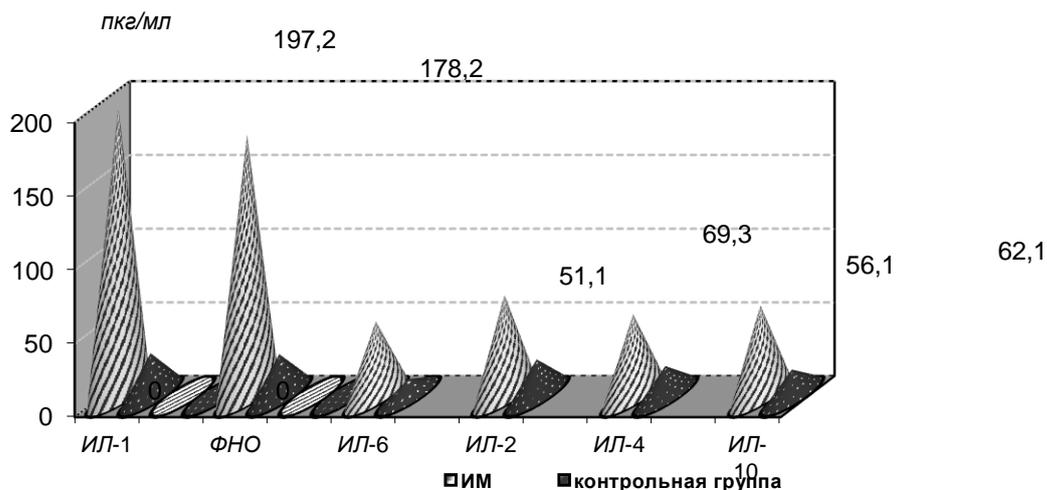


Рис. 2. Диссоциативный тип иммунного реагирования у пациентов с ИМ.

У больных ИМ с диссоциативным типом иммунного реагирования на фоне повышенных уровней провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , ФНО α и ИЛ-6) были выявлены низкие концентрации регуляторного ИЛ-2 и противовоспалительных ИЛ-4 и ИЛ-10 (рис. 2), однако эти показатели отличались достоверностью по сравнению с аналогичными данными контрольной группы ($p < 0,05$)

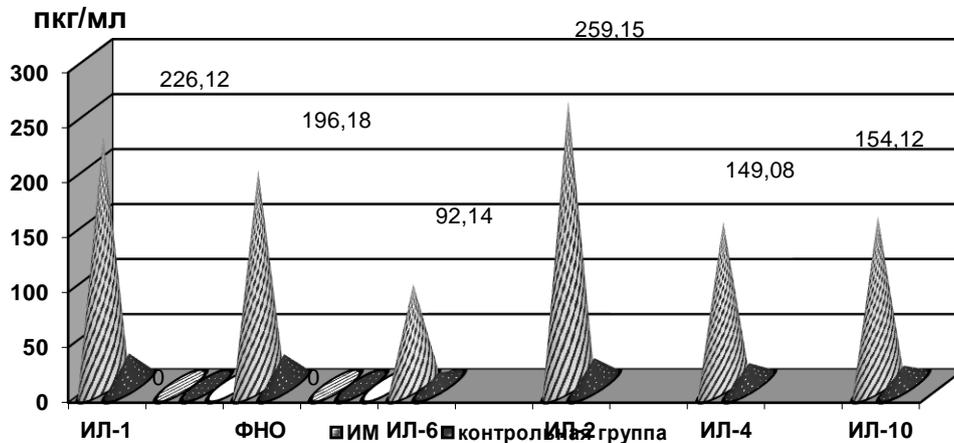


Рис. 3. Гиперреактивный тип иммунного реагирования у пациентов с ИМ.

Диссоциативный тип иммунного реагирования был выявлен у 14 пациентов (35%) с ИМ.

Динамика продукции основных исследуемых цитокинов у больных с ИМ при гиперреактивном типе иммунного реагирования представлена на рис. 3. Представленные результаты исследования при гиперреактивном типе иммунного реагирования у больных с ИМ характеризовались достоверно высокими уровнями изучаемых показателей по сравнению с аналогичными показателями у пациентов с нормореактивным типом (в среднем в 1,5-2 раза) и данными контрольной группы (в среднем в 8-10 раз) ($p < 0,05$). Этот тип был выявлен у 22,5% (9 пациентов) с ИМ.

Уровни концентраций исследуемых показателей у больных с хроническими формами ВЭБ-инфекции представлены на рисунках 4 и 5.

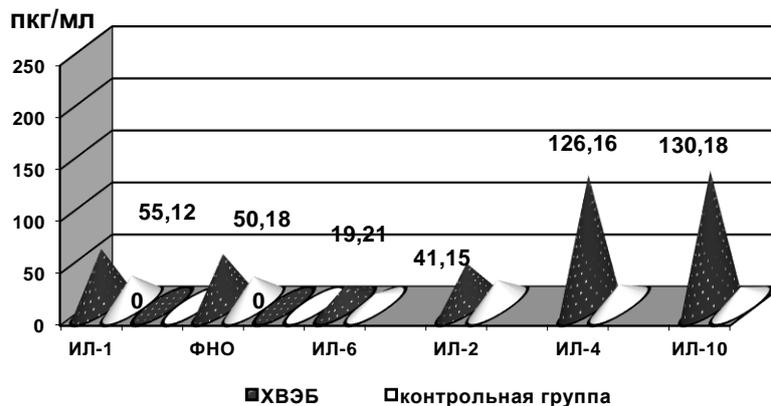


Рис. 4. Диссоциативный тип иммунного реагирования у пациентов с ХВЭБ-инфекцией.

Так, у больных с диссоциативным типом иммунного реагирования наблюдалась низкая продукция провоспалительных цитокинов и регуляторного ИЛ-2, тогда как уровни

противовоспалительных ИЛ-4 и ИЛ-10 достоверно повышались в соответствии с активностью процесса. Уровень ИЛ-4 превышал в 5,7 раза показатели контрольной группы, а ИЛ-10 в 6 раз превышал средние значения группы контроля ($p < 0,05$).

Среди пациентов с ХВЭБ с выявленным гипореактивным типом иммунного реагирования синтез провоспалительных и противовоспалительных цитокинов характеризовался низкими концентрациями (уровни ИЛ-1 β колебались от 25,32 до 72,19 пг/мл; ФНО- α – от 32,5 до 67,2 пг/мл; ИЛ-6 – от 16,1 до 27,3 пг/мл; ИЛ-2 – от 35,12 до 81,1 пг/мл; ИЛ-4 – от 25,3 до 96,45 пг/мл; ИЛ-10 – от 36,34 до 99,1 пг/мл), показатели находились практически в пределах значений контрольной группы и не отличались статистической достоверностью ($p > 0,05$).

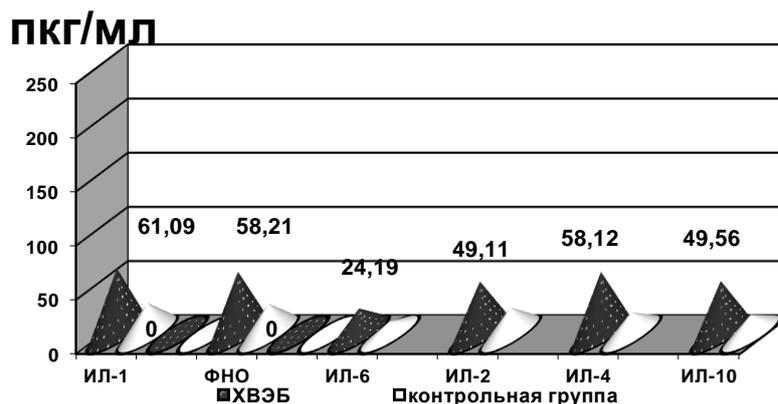


Рис.5. Гипореактивный тип иммунного реагирования у пациентов с ХВЭБ-инфекцией.

Исследованиями последних лет установлено, что цитокиновый спектр при ВЭБ-инфекции зависит от сбалансированности звеньев иммунного ответа организма, а нарушение баланса продукции цитокинов Th1/Th2 клетками играет важную роль в иммунопатогенезе. Большинство исследователей сходятся во мнении, что преобладающее участие цитокинов, продуцируемых Th-2-лимфоцитами, ассоциируется с вирусной персистенцией и хронизацией процесса, а Th-1 – со спонтанным выздоровлением и элиминацией возбудителя.

Несмотря на значительные достижения в этой области, многие вопросы характера цитокинпродуцирующей способности иммунокомпетентных клеток и их иммунопатогенетических особенностях при ХВЭБ-инфекции на сегодняшний день остаются невыясненными, а литературные данные не содержат однозначности и достаточной обоснованности.

Выводы

Полученные результаты исследований подтверждают существование цитокинового дисбаланса при различных формах ВЭБ-инфекции. Установленные типы иммунного реагирования свидетельствуют о неадекватной клеточно-гуморальной реактивности организма в условиях длительной персистенции ВЭБ. Это проявляется склонностью к подавлению клеточно-опосредованных и усилением гуморальных механизмов иммунного ответа и отображается в клинико-биохимических проявлениях болезни и приводит к затяжному волнообразному течению заболевания.

Именно функциональный дисбаланс звеньев иммунитета в сторону преимущества продукции Th2 типа, биологические эффекты которых направлены на ограничение

интенсивности и распространенности воспалительного процесса в различных органах, способствуют продлению вирусной персистенции.

Интересными и перспективными являются исследования, направленные на медикаментозную коррекцию выявленных нарушений при установленных типах иммунного реагирования у больных с ХВЭБ и изучение влияния последних на исходы заболевания, развитие осложнений и активность процесса, что станет предметом для нашего дальнейшего изучения.

Литература

1. Возіанова Ж. І. Інфекційний мононуклеоз як поліетіологічне захворювання / Ж. І. Возіанова, А. І. Глей // Сучасні інфекції. – 2004. – № 2. – С. 37-41.
2. Исаков В. А. Герпесвирусные инфекции человека: руководство для врачей. / Исаков В.А., Архипова Е.И., Исаков Д.В. – СПб., 2006. – 303 с.
3. Прохорова Н.А. Клиническое значение молекулярно-генетических и серологических исследований в диагностике инфекционного мононуклеоза / Н.А. Прохорова, Е.В. Волчкова, Г.В. Михайловская // Инфекционные болезни. – 2008. – Т.6 - №2. – С. 17-20.
4. Аллельный полиморфизм генов ИЛ-2 и ИЛ-4 при герпес-вирусной инфекции / [И. О. Наследникова, В. В. Новицкий, О. И. Уразова и др.]. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2009. – С. 39–42.
5. Горейко Т. В. Роль цитокинов в патогенезе хронической инфекции, вызванной вирусом Эпштейна-Барр / Т. В. Горейко, Н. М. Калинина, Л. В. Дружина. // Цитокины и воспаление. – 2011. – С. 44–49.
6. Кетлинский С. А. Цитокины / С. А. Кетлинский, А. С. Симбирцев. – Санкт-Петербург: ООО «Фолиант», 2008. – 552 с.
7. Красницкая А. С. Иммунологические аспекты хронического тонзиллита, ассоциированного с вирус Эпштейна-Барр инфекцией / А. С. Красницкая, Н. А. Боровская. // Фундаментальные исследования. – 2012. – С. 299–305.
8. Уровень сывороточных цитокинов при лимфопролиферативных заболеваниях / Н. П. Домникова, Е. Е. Петрусенко, О. В. Решетников, С. Л. Рыжикова, Н. А. Вараксин // Новости «Вектор-Best». – 2010. – №2 Т.56.– С. 4-7.
9. Cen O. Latent Membrane Protein 2 (LMP2) / O. Cen, R. Longnecker. // Curr Top Microbiol Immunol. – 2015. – № 391. – P. 151–180.
10. Fish K. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A enhances MYC-driven cell cycle progression in a mouse model of B lymphoma. / K. Fish, J. Chen, R. Longnecker. // Blood. – 2014. – № 123. – P. 530–540.
11. Fukuda M. Role of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif of latent membrane protein 2A (LMP2A) in Epstein-Barr virus LMP2A-induced cell transformation. / M. Fukuda, Y. Kawaguchi. // J. Virology. – 2014. – № 88. – P. 5189–5194.
12. EBV BILF1 evolved to downregulate cell surface display of a wide range of HLA class I molecules through their cytoplasmic tail / [B. D. Griffin, A. M. Gram, A. Mulder та ін.]. // J. Immunology. – 2013. – №190. – С. 1672–1684. The pathogenesis of Epstein-Barr virus persistent infection. / D. A. Thorley-Lawson, J. B. Hawkins, S. I. Tracy, M. Shapiro. // Curr. Opin. Virol.. – 2013. – №3. – С. 227–232.

ОСОБЛИВОСТІ ПРОДУКЦІЇ ЦИТОКІНІВ ПРИ РІЗНИХ ФОРМАХ ЕПШТЕЙНА-БАРР ВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ

М. М. Попов, Т. І. Лядова, О. Г. Сорокіна.

У роботі представлені результати дослідження рівнів основних регуляторних цитокінів у пацієнтів з різними формами Епштейна-Барр вірусної інфекції.

Аналіз динаміки цитокінового профілю у хворих з Епштейна-Барр вірусної інфекції дозволив виявити різноспрямовані зміни синтезу досліджуваних прозапальних і протизапальних цитокінів, що було підставою для встановлення чотирьох типів імунного реагування. Отримані дані підтверджують існування цитокінового дисбалансу при Епштейна-Барр вірусної інфекції. Встановлені типи імунного реагування свідчать про неадекватну клітинно-гуморальної реактивності організму в умовах тривалої персистенції Епштейна-Барр вірусної інфекції, що проявляється схильністю до придушення клітинно-опосередкованих та посиленням гуморальних механізмів імунної відповіді і відображається в клініко-біохімічних проявах хвороби, а також призводить до затяжного хвилеподібний перебіг.

Ключові слова: імунітет, цитокіни, типи імунного реагування, ВЕБ-інфекція.

FEATURES OF CYTOKINE PRODUCTION IN DIFFERENT FORMS OF EPSTEIN-BARR VIRUS INFECTION

M. M. Popov, T. I. Liadova, O. G. Sorokina.

In article presented results of the study of basic levels of regulatory cytokines in patients with various forms of Epstein-Barr virus infection. Analysis of the dynamics of cytokine profile in patients with Epstein-Barr virus infection revealed the opposite changes studied synthesis of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines, which was the basis for the establishment of the four types of immune response. The findings confirm the existence of cytokine imbalance with Epstein-Barr virus infection. The established types of immune responses indicate inadequate cell humoral reactivity in a long persistence of Epstein-Barr virus infection, which manifests a tendency to suppression of cell-mediated and humoral immune response enhancement mechanisms and displayed in the clinical and biochemical manifestations of the disease, and also leads to prolonged undulating course.

Key words: immunity, cytokines, types of immune response, EBV infection