

Т. І. Лядова, А. М. Попова

СТАН ІМУННОЇ СИСТЕМИ ТА ХАРАКТЕР ІМУННИХ ПОРУШЕНЬ У ВЗАЄМОЗВ'ЯЗКУ З НАПРУЖЕНОСТЮ ІМУНІТЕТУ ДО ДИФТЕРІЇ ТА ПРАВЦЯ В ОСІБ, ЯКІ ПЕРЕХВОРИЛИ НА ХВЕБІ

Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

Епштейна-Барр вірусна інфекція (ВЕБ-інфекція) є однією із найпоширеніших у світі. Вірусом Епштейна-Барр інфіковано біля 90 % населення планети.

Активна проліферація вірусу у лімфоїдних органах може призводити до значних структурних змін і функціональної активності, спричиняти лімфаденопатію, гепато- та спленомегалію, індукувати імунодефіцитний стан, лімфопроліферативні та онкологічні процеси, синдром хронічної втоми.

Мета роботи – вивчити стан імунної системи і визначити характер імунних порушень в осіб, які перехворіли на ХВЕБІ, у взаємозв'язку з напруженістю імунітету до дифтерії та правця.

Матеріали і методи. Було вивчено стан імунної системи і характер імунних порушень у дорослих, які перенесли ХВЕБІ, серед яких 16 осіб (1-а група), які не мають одночасно захисного рівня антитіл (АТ) до дифтерії та правця та у 16 дорослих (2-а група), в яких є захисний рівень АТ до цих інфекцій. Контрольну групу склали 20 осіб. Середній вік обстежених становив $(20,3 \pm 2,3)$ року. Вивчали стан Т-, В- і фагоцитарної ланки імунітету. Результати досліджень було опрацьовано методом варіаційної та кореляційної статистики з використанням програми «Statistica 10,0 for Windows».

Результати досліджень та їх обговорення. Встановлено, що в осіб 1-ї і 2-ї групи, які перехворіли на ХВЕБІ, після повного клінічного одужання спостерігаються порушення в імунній системі, які зачіпають всі ланки імунітету. Так, у Т-ланці відбувається вірогідне зниження бласттрансформувальної здатності Т-лімфоцитів, підвищення вмісту CD8⁺ та CD16⁺-клітин у крові, підвищення рівня лімфоцитів, які експресують молекули апоптозу CD95⁺, Vcl-2, порушення співвідношення CD4⁺/CD8⁺-клітин та CD8⁺CD28⁺/CD8⁺CD28⁻ за рахунок підвищення вмісту серед лімфоцитів клітин із цитотоксичними і супресорними влас-

тивостями. У фагоцитарній ланці відбувається вірогідне зниження поглинальної та перетравлювальної здатності лейкоцитів крові. В осіб 2-ї групи серед основних класів імуноглобулінів реєструється вірогідне підвищення рівня IgG.

Висновок. В осіб, які перехворіли на ВЕБ-інфекцію, спостерігаються розлади в Т-, В- і фагоцитарній ланках імунітету. Відсутність захисного рівня АТ до дифтерії та правця в осіб, які перехворіли на ХВЕБІ, асоціюється з дисбалансом серед Т-регуляторних клітин, низьким вмістом Т-хелперів, високим відсотком Т-супресорів, низьким рівнем проліферативної активності Т-лімфоцитів, високим відсотком лімфоцитів, які експресують маркери апоптозу.

Ключові слова: ВЕБ, хронічна ВЕБ-інфекція, загальний імунітет, імунітет до дифтерії та правця.

ВЕБ-інфекція є однією із найпоширеніших у світі. Вірусом Епштейна-Барр інфіковано біля 90 % населення планети. Протягом тривалого часу ВЕБ-інфекцію асоціювали тільки з інфекційним мононуклеозом (ІМ) у дітей, але в останні роки вона все частіше діагностується серед дорослого населення. Вірус проявляє найбільший тропізм до лімфоцитів, моноцитів, макрофагів, нейтрофілів, що визначає особливості клінічних уражень і дозволяє визначити цей процес як інфекцію імунної системи.

Активна проліферація вірусу у лімфоїдних органах здатна призводити до значних структурних змін і функціональної активності, викликати лімфаденопатію, гепато- та спленомегалію, індукувати імунодефіцитні стани, лімфопроліферативні та онкологічні процеси, синдром хронічної втоми [1-5].

Найефективнішим засобом боротьби з інфекційними хворобами є вакцинація. В Україні діє календарний план щеплень від найбільш небезпечних інфекцій. Це

дозволяє зберігати життя та здоров'я мільйонам дітей та дорослих [6].

В попередніх наших дослідженнях було встановлено, що в осіб, які перехворіли в середньотяжкій і тяжкій формах на ІМ та ХВЕБІ, спостерігається зниження рівня захисних АТ до дифтерії та правця або їх відсутність. Наші дослідження засвідчили, що ВЕБ-інфекція здатна викликати не тільки імунодефіцитний стан, але й призводити до порушення специфічного імунітету. Враховуючи це, дослідили імунні зміни та їх залежність від напруженості імунітету до дифтерії та правця.

Мета роботи – вивчити стан імунної системи і встановити особливості імунних порушень в осіб, які перехворіли на ХВЕБІ, у взаємозв'язку з напруженістю імунітету до дифтерії та правця.

Матеріали і методи

Дослідження виконано на клінічній базі кафедри інфекційних хвороб та клінічної імунології медичного факультету Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Дизайн роботи погоджено з Комісією з питань біоетики медичного факультету Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна із висновком про відповідність до вимог морально-етичних норм біоетики згідно з правилами ІСН/ГСР, Гельсінської декларації прав людини (1964), Конвенцією Ради Європи з прав людини і біомедицини (1997), а також із чинним законодавством України.

Відповідно до мети роботи було сформовано дві групи дорослих, які перехворіли на ХВЕБІ: 1 група – 16 осіб, в яких зареєстровано відсутність захисного рівня АТ до дифтерії та правця; 2 група – 16 осіб, в яких був захисний рівень АТ до цих інфекцій. Контрольну групу склали 20 дорослих. Середній вік обстежених становив $(20,3 \pm 2,3)$ роки.

Імунологічні дослідження були виконані в лабораторії «Аналітика» (ліцензія МОЗ України №554074 від 20.05.2010 р.). Матеріалом для дослідження були кров і сироватка пацієнтів, які перехворіли на ХВЕБ.

Рівень АТ до дифтерійного та правцевого токсину вимірювали методом ІФА згідно з інструкцією. Захисним рівнем АТ до цих інфекцій, відповідно до рекомендацій ВООЗ, вважали $>0,1$ МО/мл.

Популяційний та субпопуляційний склад лімфоцитів крові визначали за допомогою проточної лазерної цитометрії на апараті FACS-Calibur (США) з використанням моноклональних АТ: анти-CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD22⁺, CD16⁺ (eBioscience, Beckman Coulter, R&D System). Усі стадії підготовки проб для лазерної цитофлюориметрії здійснювали відповідно до протоколів виробника.

Проліферативну активність лімфоцитів крові оцінювали за рівнем спонтанної та ФГА-індукованої (фітогемаглютинін-індукованої) бласттрансформації клітин у культурі *in vitro* (РБТЛ). Інтенсивність проліферації клітин оцінювали

морфологічно за відсотком формованих бластних форм. Клітини культивували 72 год у повному середовищі RPMI-1640, що містило 20 % ембріональної телячої сироватки, в атмосфері 5 % CO₂. ФГА додавали в культуральне середовище в дозі 5 мг/мл [7].

Рівень Vcl-2 визначали у сироватці крові методом ІФА з використанням комерційного імуноферментного набору фірми «RayBiotech, Inc» згідно з інструкцією виробника. Порогові величини визначення Vcl-2 були 0,5 нг/мл.

Рівні IgA, IgM, IgG у сироватці крові вимірювали методом ІФА згідно з інструкцією. Отримані дані виражали у г/л.

Фагоцитарну активність лейкоцитів крові оцінювали за їхньою здатністю поглинати бактерії *S. aureus* (штам 209) [8]. Визначали фагоцитарне число (ФЧ) – число клітин, які фагоцитували, та фагоцитарний індекс (ФІ) – число бактерій, які поглиналися однією клітиною. Бактерицидну здатність – біоцидність (БЦ) фагоцитів оцінювали за методом S. Nielsen [9].

Кисень-залежну метаболічну активність фагоцитів вивчали у спонтанному та індукованому замазаном НСТ-тесті, відповідно до рекомендацій Е. У. Пастер [8, 9].

Результати досліджень опрацьовано методом варіаційної та кореляційної статистики з використанням програми «Statistica 10.0 for Windows». Для кожного варіаційного ряду розраховували середню арифметичну (М), середнє квадратичне відхилення (σ), середню помилку середньої арифметичної (m). Оцінку вірогідності різниць середніх величин у групах (р) здійснювали за допомогою критерію Ст'юдента (t). Відмінності вважалися статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення

У результаті досліджень було встановлено, що в осіб 1-ї і 2-ї групи, які перехворіли на ХВЕБІ, після повного клінічного одужання спостерігаються порушення в імунній системі, які зачіпають всі ланки імунітету. У Т-ланці імунітету відбувається вірогідне зниження бласттрансформувальної здатності Т-лімфоцитів, підвищення вмісту CD8⁺ та CD16⁺-клітин, підвищення рівня лімфоцитів, які експресують молекули апоптозу CD95⁺, Vcl-2, порушення співвідношення CD4⁺/CD8⁺, та CD8⁺CD28⁺/CD8⁺CD28⁻ за рахунок підвищення вмісту серед лімфоцитів клітин з цитотоксичними і супресорними властивостями. У фагоцитарній ланці встановили вірогідне зниження поглинальної та перетравлювальної здатності лейкоцитів крові. В осіб 2-ї групи серед основних класів імуноглобулінів реєструється вірогідне підвищення рівня IgG (табл. 1-3).

При порівнянні імунного статусу осіб 1-ї групи, в яких після захворювання не спостерігалось захисного рівня АТ до дифтерії та правця, з особами 2-ї групи, які мали захисні рівні АТ до цих інфекцій, було встановлено, що

Таблиця 1

Популяційний та субпопуляційний склад лімфоцитів периферичної крові осіб, які перехворіли на ХВЕБІ (M±m)

Показник	Група обстежених		
	1-а (n=16)	2-а (n=16)	Контроль
Лейкоцити ×10 ⁹ /л	5,6±0,3*,**	6,1±0,3	6,5±0,2
Лімфоцити ×10 ⁹ /л	1,6±0,2*,**	2,0±0,2	2,3±0,1
%	30,1±1,4*,**	34,6±1,6	35,9±1,3
CD3+-клітини, %	52,7±2,8*,**	60,1±2,4	62,9±2,0
CD4+-клітини, %	30,1±2,0*,**	36,7±2,1	39,4±1,8
CD8+-клітини, %	26,9±1,6*	26,3±2,4	21,7±1,3
CD22+-клітини, %	22,7±1,6	23,1±1,6	19,5±1,0
CD16+-клітини, %	15,4±1,1*	14,3±1,2*	11,3±0,7
РБТЛ, %	7,7±0,4	7,6±0,4	8,1±0,4
РБТЛ інд ФГА, %	40,9±4,2*,**	51,1±3,6*	63,2±3,7
CD4+/CD8+	1,11±0,06*,**	1,39±0,07*	1,81±0,08
CD95+-клітини, %	8,3±0,8*,**	4,7±0,6*	3,5±0,2
Vcl-2+, нг/мл	5,5±0,6*,**	2,9±0,3*	2,3±0,2
CD8+CD28+, %	16,6±1,4*,**	20,1±2,1*	16,5±1,9
CD8+CD28-, %	9,2±0,8*,**	6,1±0,5*	4,1±0,2
CD8+CD28+/CD8+CD28-	1,8±0,1*,**	3,2±0,3	4,0±0,2

Примітка: *p<0,05 між показниками 1-ї групи, 2-ї групи та контрольною групою.

**p<0,05 між показниками 1-ї і 2-ї групи.

Таблиця 2

Вміст IgA, IgM, IgG у сироватці крові осіб, які перехворіли на ХВЕБІ (M±m)

Показник	Група обстежених		
	1-а	2-а	Контроль
IgA, г/л	1,19±0,08	1,22±0,08	1,21±0,08
IgM, г/л	1,27±0,08	1,11±0,07	1,13±0,06
IgG, г/л	12,9±1,1	13,83±1,2*	11,37±0,7

Примітка: *p<0,05 між показниками 1-ї, 2-ї та контрольною групою.

Таблиця 3

Фагоцитарна та біоцидна активність лейкоцитів периферичної крові осіб, які перехворіли на ХВЕБІ (M±m)

Показник	Група обстежених		
	1-а	2-а	Контроль
ФЧ	50,1±2,9*,**	59,6±3,1*	69,1±2,6
ФІ	4,0±0,2*,**	5,1±0,4*	6,6±0,3
БЦ	7,0±0,4*,**	6,0±0,4*	4,1±0,3
НСТ сп.	10,3±0,7	11,7±0,7	11,3±0,6
НСТ інд.	19,3±1,0*,**	26,2±1,8	29,6±2,1

Примітка: *p<0,05 між показниками 1-ї групи, 2-ї групи та контрольною групою.

**p<0,05 між показниками 1-ї і 2-ї групи.

у осіб 1-ї групи більшою мірою знижено вміст CD3⁺-лімфоцитів (на 12,4 %), CD4⁺-лімфоцитів (на 18,0 %), знижена бласттрансформувальна здатність Т-клітин на ФГА (на 20 %). У той же час серед осіб 1-ї групи підвищений рівень CD95⁺-клітин у крові (в 1,7 разу), в сироватці крові Vcl-2 (в 1,8 разу) та вміст Т-супресорів (в 1,5 рази) (табл. 1). У 1-ї групі обстежених серед популяції Т-клітин (CD3⁺) спостерігалось значніше підвищення частини Т-лімфоцитів з фенотипом CD8⁺ і зменшення частини Т-лімфоцитів з фенотипом CD4⁺, а також збільшення серед CD8⁺-клітин частки CD8⁺CD28⁻клітин, які володіють супресорними властивостями. Так, відношення CD4⁺/CD8⁺-клітин у 1-ї групі становило (1,11±0,06), в 2-ї групі – (1,35±0,07) (p<0,05), у контрольній групі – (1,81±0,8). Відношення CD8⁺CD28⁺/CD8⁺CD28⁻клітин у 1-ї групі дорівнювало 1,8±0,1, в 2-ї групі – (3,2±0,3) (p<0,05), у контрольній групі – (4,0±0,2). При вивченні концентрації в сироватці крові основних класів імуноглобулінів вірогідних відмінностей між особами 1-ї і 2-ї групи знайдено не було (p>0,05) (табл. 2). Спостерігалось незначне підвищення рівня в сироватці крові обох груп IgG порівняно з контрольною групою, відповідно на 12,3 і 21,6 %. У фагоцитарній ланці імунітету відмінності між особами 1-ї і 2-ї групи стосувалось всіх основних показників функціональної активності лейкоцитів крові. Так, ФЧ в осіб 1-ї групи було нижче, ніж у осіб 2-ї групи на 26,0 %, ФІ – на 21,6 %, БЦ – на 14,3 %, НСТ інд – на 26,4 % (табл. 3). У той же час, серед осіб 2-ї групи ці показники були нижчими, ніж у контрольній групі: ФЧ – на 13,8 %, ФІ – на 22,8 %, БЦ – на 31,7 %.

Узагальнюючи отримані дані, можна констатувати, що ВЕБ-інфекція пригнічує як загальну імунореактивність організму, так і специфічний імунітет.

Підтримка на високому рівні специфічних АТ потребує їх постійної продукції. Відомо, що період напів-

розпаду IgG становить 21 добу. Тобто, для підтримки антитілоутворення необхідна висока функціональна активність всіх категорій імунокомпетентних клітин: дендритних клітин, макрофагів, Т- і В-лімфоцитів, клітин «пам'яті». Розлад у будь-якій ланці імунної системи або на етапі імунного процесу здатний призводити до пригнічення антитілоутворення. Відомо, що єдиними продуцентами АТ є плазматичні клітини, які утворюються під впливом Т-хелперів із В-лімфоцитів. Для трансформації В-лімфоцитів у плазматичну клітину дуже важливим є прямий контакт між цими клітинами. Процеси антитілоутворення також перебувають під контролем цитокинової мережі та регулюються нею. ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-5 здатні активувати В-лімфоцити, ІЛ-15, ІЛ-21, ІЛ-23 регулюють активність Т- і В-клітин «пам'яті». Основним продуцентом цих цитокинів є Т-хелпери. Підвищення рівня Т-супресорів здатне пригнічувати процеси антитілоутворення. Тобто для активізації процесів антитілоутворення дуже важливим є відновлення механізмів контролю і регуляції імунних процесів, що своєю чергою потребує відновлення імунореактивності організму взагалі. Особи, які перехворіли на ВЕБ-інфекцію і мають розлади в імунній системі, потребують курсу імунореабілітації і, за відсутності захисного рівня АТ до керованих інфекцій, потребують позачергового щеплення.

Висновок

В осіб, які перехворіли на ВЕБ-інфекцію, спостерігаються розлади в Т-, В- і фагоцитарній ланках імунітету. Відсутність захисного рівня АТ до дифтерії та правця в осіб, які перехворіли на ХВЕБІ, асоціюється з дисбалансом серед Т-регуляторних клітин, низьким вмістом Т-хелперів, високим відсотком Т-супресорів, низьким рівнем проліферативної активності Т-лімфоцитів, високим відсотком лімфоцитів, які експресують маркери апоптозу.

Література

1. Balfour Jr, H. H. (2022). The burden of Epstein-Barr virus infections in children. *Jornal de Pediatria*, 98, 115-116.
2. Rostgaard, K., Balfour Jr, H. H., Jarrett, R., Erikstrup, C., Pedersen, O., Ullum, H., ... & Hjalgrim, H. (2019). Primary Epstein-Barr virus infection with and without infectious mononucleosis. *PLoS one*, 14(12), e0226436.
3. Sylvester, J. E., Buchanan, B. K., & Silva, T. W. (2023). Infectious Mononucleosis: Rapid Evidence Review. *American Family Physician*, 107(1), 71.
4. Shetty, K., Bronze, M. S., Bengel, E. (2021). Epstein-Barr Virus (EBV) Infectious Mononucleosis (Mono) Clinical Presentation. *Medscape*. Retrieved from <https://emedicine.medscape.com/article/222040-clinical#showall>
5. Golubovska, O. A., Andreychyn, M. A., Shkurba, A. D. (2022). *Infectious diseases*. Medical University «Medicine» [in Ukrainian].
6. Chernyshova, L. I., Lapii, F. I., Volokha, A. P. (Ed.). (2018). *Immunoprophylaxis of infectious diseases: educational and methodological manual*. Kyiv: Medical University «Medicine» [in Ukrainian].
7. Sachs, B., Fatangare, A., Sickmann, A., & Glässner, A. (2021). Lymphocyte transformation test: history and current approaches. *Journal of immunological methods*, 493, 113036.
8. Pasteur, E. U., Ovod, V. V., Pozur, V. K., Vikhot, N. E. (1989). *Immunology: workshop*. Kiev: Vyshcha shkola [in Russian].
9. Scherbina, I. N. (2008). Peculiarities of Immune Reactivity in Women with Urogenital Disorders in Perimenopause Period. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*, 18(3), 332-334.

STATUS OF THE IMMUNE SYSTEM AND CHARACTER OF IMMUNE DISORDERS IN RELATION TO IMMUNITY STRENGTH TO DIPHTHERIA AND TETANUS IN PERSONS WHO HAVE HAD EBV INFECTION

T. I. Lyadova, A. M. Popova

V. N. Karazin Kharkiv National University

SUMMARY. EBV infection is one of the most common in the world. About 90 % of the world's population is infected with the Epstein-Barr virus.

Active proliferation of the virus in lymphoid organs can lead to significant structural changes and functional activity, cause lymphadenopathy, hepato- and splenomegaly, induce immunodeficiency, lymphoproliferative and oncological processes, chronic fatigue syndrome.

The purpose of the work: to study the state of the immune system and to determine the nature of immune disorders in persons who have had EBV infection in relation to the intensity of immunity to diphtheria and tetanus.

Materials and methods. The state of the immune system and the nature of immune disorders were studied in 16 adults (group 1), who do not have a protective level of antibodies to diphtheria and tetanus at the same time, and in 16 adults (group 2), who have a protective level of antibodies to these infections, who fell ill with EBV infection. The control group consisted of 20 people. The average age of the examined was (20.3±2.3) years. In the work, the state of the T-, B- and phagocytic link of immunity was studied. The results of the research were processed by the method of variation and correlation statistics using the «Statistica 10.0 for Windows» program.

Results and discussion. As a result of the conducted research, it was established that in persons 1 gr and 2 gr who fell ill with EBV infection after complete clinical recovery, disorders in the immune system are observed that affect all links of immunity. In the T-chain of immunity, there is a likely decrease in the blast-transforming ability of T-lymphocytes, an increase in the content of CD8⁺ and CD16⁺-cells in the blood, an increase in lymphocytes expressing the apoptosis molecules CD95⁺, Bcl-2, a violation of the ratio of CD4⁺/CD8⁺s, and CD8⁺CD28⁺/CD8⁺ CD28⁻ cells due to an increase in the content of

cells with cytotoxic and suppressive properties among lymphocytes. In the phagocytic chain, there is a probable decrease in the absorptive and digestive capacity of blood leukocytes. Among the main classes of immunoglobulins, there is a probable increase in the level of IgG in persons of group 2.

Conclusion. Disorders in the T-, B- and phagocytic links of immunity are observed in persons who have contracted EBV-infection. The absence of a protective level of antibodies against diphtheria and tetanus in persons who have contracted EBV infection is associated with an imbalance among T-regulatory cells, a low content of T-helpers in the blood, a high percentage of T-suppressors, a low level of proliferative activity of T-lymphocytes, a high percentage of T-lymphocytes in the blood lymphocytes expressing markers of apoptosis.
Key words: EBV infection; general immunity; immunity to diphtheria and tetanus.

Відомості про авторів:

Лядова Тетяна Іванівна – д. мед. наук, професорка, професорка кафедри інфекційних хвороб та клінічної імунології медичного факультету Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна; e-mail: t.lyadova@karazin.ua

ORCID ID – <https://orcid.org/0000-0002-5892-2599>

Попова Аліса Миколаївна – аспірантка кафедри інфекційних хвороб та клінічної імунології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна; e-mail: alisa.popova96@ukr.net

ORCID ID – <https://orcid.org/0009-0005-7713-5776>

Information about the authors:

Lyadova T. I. – MD, Professor, Dean of the medical faculty of V. N. Karazin Kharkiv National University; e-mail: t.lyadova@karazin.ua

ORCID ID – <https://orcid.org/0000-0002-5892-2599>

Popova A. M. – PhD fellow, Department of Infectious Diseases and Clinical Immunology of V. N. Karazin Kharkiv National University; e-mail: alisa.popova96@ukr.net

ORCID ID – <https://orcid.org/0009-0005-7713-5776>

Конфлікт інтересів: немає.

Authors have no conflict of interest to declare.

Отримано 10.07.2023 р.