

УДК 612.017.1:616.523:616.092:57.083.3

РОЛЬ МОНОЦИТАРНОЙ ФРАКЦИИ МОНОНУКЛЕАРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В РЕГУЛЯЦИИ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ГЕРПЕТИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ

© Коляда Т.И.¹, Макаревич В.А.²

¹ Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова
Национальной академии медицинских наук Украины, Харьков, Украина;
² Луганский государственный медицинский университет, Луганск, Украина
E-mail: kolyada-t.i@mail.ru

При обследовании 86 пациентов с рецидивирующей герпетической инфекцией установлено достоверное снижение содержания перфорин-позитивных цитотоксических лимфоцитов. Оценка способности ВПГ-стимулированных клеток моноцитарной фракции мононуклеаров периферической крови влиять на относительное содержание перфорин-позитивных цитотоксических лимфоцитов показала, что наибольший индекс влияния выявляется у пациентов с высокой частотой рецидивов, что может свидетельствовать о большей вовлечённости антигенпрезентирующих клеток моноцитарной фракции мононуклеаров в регуляцию цитотоксической функции эффекторных клеток. Стимуляция антигеном ВПГ позволила сделать вывод о способности клеток моноцитарной фракции мононуклеаров активировать эффекторное звено иммунитета. Полученные данные свидетельствуют о том, что перфориновый потенциал цитотоксических лимфоцитов может служить показателем, отражающим состояние антигенпрезентирующей функции моноцитарных клеток.

Ключевые слова: рецидивирующая герпетическая инфекция, клеточная кооперация, цитотоксические лимфоциты, моноциты.

ROLE OF MONOCYTE FRACTION OF PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS IN THE REGULATION OF LYMPHOCYTE CYTOTOXIC POTENTIAL IN HERPETIC INFECTION

Kolyada T.I.¹, Makarevich V.A.²

¹ I.I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine; ² Lugansk State Medical University, Lugansk, Ukraine

The study of 86 patients with recurrent herpes infection found a significant reduction of perforin-positive cytotoxic lymphocytes. The assessment of capacity of HSV-stimulated monocyte cell fraction of peripheral blood mononuclear cells for influencing the relative content of perforin-positive cytotoxic lymphocytes revealed the greatest impact index in patients with a high relapse rate that might indicate greater involvement of antigen-presenting cells of the monocyte fraction of mononuclear cells in the regulation of the cytotoxic effector cells' function. HSV antigen challenge led to the conclusion about the ability of cells of the monocyte fraction of mononuclear cells to activate immune effector unit. The findings suggest that the perforin potential of cytotoxic lymphocytes might be an indicator reflecting the state of the antigen-presenting function of monocytic cells.

Keywords: recurrent herpes infection, cell cooperation, cytotoxic lymphocytes, monocytes.

Герпетическая инфекция является значимой медико-социальной проблемой, требующей углублённого изучения иммунопатологических механизмов заболевания, совершенствования подходов к его диагностике и терапии [1, 2, 5]. Рецидивирующая герпетическая инфекция (РГИ) связана с персистенцией вируса простого герпеса (ВПГ) и сопровождается развитием иммунодефицитных состояний, обусловленных недостаточностью различных звеньев иммунной системы [5]. Углубленное понимание патогенетических механизмов развития РГИ невозможно без изучения особенностей клеточной кооперации иммунокомпетентных клеток. Примером такого взаимодействия является активация цитотоксических лимфоцитов клетками моноцитарной фракции мононуклеаров

(МФМ) периферической крови, дисфункция которых может отражаться на их способности активировать цитотоксические лимфоциты [8, 10]. В связи с этим представляет интерес модулирующее влияние антигена ВПГ на способность клеток МФМ периферической крови активировать эффекторное звено иммунитета.

Известно, что цитотоксические лимфоциты осуществляют противовирусную защиту путём киллинга инфицированных вирусами клеток, а одним из ключевых механизмов реализации цитотоксической функции является экзоцитоз литических гранул, содержащих перфорин и гранзимы, при этом количество перфорин-позитивных клеток может существенно изменяться при различных патологиях [7, 9].

Целью работы была оценка способности ВПГ-стимулированных клеток МФМ периферической крови влиять на относительное содержание перфорин-позитивных цитотоксических лимфоцитов у пациентов с различной частотой рецидивов герпетической инфекции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании приняли участие 86 пациентов в возрасте от 18 до 49 лет с верифицированным диагнозом «герпетический гингивостоматит и фаринготонзиллит» (код В00.2 по МКБ-10) с манифестацией в полости рта, а также «герпетический везикулярный дерматит» (код В00.1 по МКБ-10) с назолабиальной манифестацией. Пациенты обследовались в лаборатории клинической иммунологии и аллергологии ГУ «Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова Национальной академии медицинских наук Украины». Контрольную группу составили 19 практически здоровых людей сопоставимого возраста. Все пациенты и здоровые доноры, принявшие участие в исследовании, дали добровольное письменное согласие на участие в исследовании.

Критерием включения в исследование было наличие у пациента верифицированного диагноза, рецидива герпетической инфекции в течение последнего месяца, а также иммунной недостаточности. Из исследования исключались пациенты, получавшие иммуномодулирующую терапию в период последних 3 месяцев до включения в обследование, больные с транзиторными нарушениями иммунитета, а также пациенты с другими хроническими заболеваниями в стадии обострения и декомпенсации. Больные с РГИ были разделены на две группы: группа I – пациенты с умеренной частотой рецидивов < 4 раз в год (n = 51); группа II – пациенты с высокой частотой рецидивов ≥ 4 раз в год (n = 35).

Определение субпопуляций CD8+ лимфоцитов и натуральных киллеров выполняли методом люминесцентной микроскопии с использованием FITC-меченых моноклональных антител к дифференцировочным антигенам CD8 и CD16 производства компании «Медбиоспектр» (Москва, Россия) [4].

Выделение мононуклеарных клеток проводили на градиенте плотности фиколла-верографина ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$) и доводили до концентрации 5×10^6 /мл. Выделенные мононуклеары инкубировали в стерильных планшетах в полной среде культивирования (ПКС) течение 2 часов при $t = 37^\circ\text{C}$ и атмосфере

5% CO_2 . Разделение клеток, полученных на данном этапе, на прилипающую моноцитарную фракцию и не прилипающую лимфоцитарную фракцию проводили путём отбора адгезированной фракции.

Клетки МФМ, полученные от пациентов с РГИ с различной частотой рецидивов, а также практически здоровых доноров, разделялись и культивировались в двух параллельных сериях: без добавления индуктора и с добавлением инактивированного формалином вируса простого герпеса 1 и 2 типа (герпетическая вакцина «Витагерпевак», Россия) в концентрации 10^7 вирионов/мл. Лимфоциты инкубировались без добавления индуктора.

Для оценки способности клеток МФМ изменять цитотоксические свойства аутологичных лимфоцитов, клетки соответствующих фракций инкубировали совместно в соотношении стимулирующих и отвечающих клеток 10:1. Через 24 часа оценивали содержание перфорин-позитивных (Pг+) цитотоксических CD8+ лимфоцитов и натуральных киллеров по количеству клеток с внутриклеточным содержанием перфорина методом иммунофенотипирования. Для этого лимфоциты пермеабелизировали раствором Permeab (Becton Dickinson, США), культивировали 30 мин с PE-мечеными моноклональными антителами к перфоруину (Becton Dickinson, США) при $t = 18-20^\circ\text{C}$, отмывали, готовили мазки и подсчитывали количество цитотоксических клеток с внутриклеточным содержанием перфорина в поле зрения люминесцентного микроскопа [8].

Статистическую обработку полученных данных проводили на персональном компьютере с использованием программы STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc). При обработке данных использовали непараметрические методы (U-критерий Манна–Уитни, коэффициент корреляции Спирмана), при нормальном распределении использовали t-критерий Стьюдента. В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Определение субпопуляций лимфоцитов в периферической крови пациентов с РГИ и здоровых доноров контрольной группы выявило, что суммарное содержание CD8+ и CD16+ клеток среди лимфоцитов у пациентов с умеренной частотой рецидивов РГИ было достоверно выше показателя в контрольной группе (табл. 1). В

группе пациентов с высокой частотой рецидивов РГИ суммарное содержание эффекторных лимфоцитов было ниже контроля ($p < 0,05$).

У пациентов I группы содержание Pr+ лимфоцитов, инкубированных без добавления клеток МФМ, было достоверно снижено как относительно показателя контрольной группы, так и относительно группы с частыми рецидивами заболевания. При этом в II группе содержание Pr+ лимфоцитов не имело достоверных отличий от контроля.

Совместная инкубация в течение 24 ч. с не-стимулированными клетками МФМ приводила к недостоверному повышению количества Pr+ клеток во всех группах. При этом индекс влияния не превышал 1,2 в группах пациентов с РГИ и 1,1 в контрольной группе. Индекс влияния рассчитывали как соотношение количества Pr+ клеток в серии к количеству этих клеток среди лимфоцитов, инкубированных без клеток МФМ [3].

Полученные результаты могут свидетельствовать о недостаточном количестве зрелых антигенпрезентирующих клеток МФМ, способных активировать отвечающие эффекторные лимфоциты.

В то же время инкубация аутологичных лимфоцитов с ВПП-стимулированными клетками МФМ выявила значительный рост количества Pr+ лимфоцитов в II группе с индексом влияния равным 2,1. В группе пациентов с умеренной частотой рецидивов заболевания индекс влияния, составил 1,5, а в контрольной группе – 1,6. При этом в группе с умеренной частотой рецидивов суммарное содержание CD8+ и CD16+ лимфоцитов с внутриклеточным содержанием перфорины было в 1,4 раза ниже контроля.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что применение ВПП-антигена в составе герпетической вакцины в качестве стимулятора клеток моноцитарной фракции мононуклеаров у пациентов с РГИ с иммунными нарушениями способно индуцировать увеличение относительного количества Pr+ цитотоксических лимфоцитов. При этом наибольший индекс влияния выявлен у пациентов с высокой частотой рецидивов заболевания, что может свидетельствовать о большей вовлечённости клеток моноцитарной фракции мононуклеаров в регуляцию цитотоксической функции эффекторных клеток. Увеличение роли антигенпрезентирующих клеток может рассматриваться, с одной стороны, как компенсаторный механизм, связанный со снижением продукции интерферонов у пациентов с частыми рецидивами, а с другой стороны, может быть следствием фенотипических особенностей клеток моноцитарной фракции у данных пациентов [6].

Таким образом, у пациентов с РГИ выявлено достоверно сниженное относительно здоровых доноров содержание Pr+ цитотоксических лимфоцитов, более выраженное при высокой частоте рецидивов заболевания. Стимуляция антигеном ВПП позволила сделать вывод о роли клеток моноцитарной фракции мононуклеаров в регуляции противовирусного иммунитета, в частности – об их способности активировать эффекторное звено иммунитета. Полученные данные свидетельствуют о том, что перфориновый потенциал цитотоксических лимфоцитов может служить показателем, отражающим состояние антигенпрезентирующей функции моноцитарных клеток.

Таблица 1

Влияние интактных и ВПП-стимулированных клеток МФМ на количество Pr+ цитотоксических Т-лимфоцитов и натуральных киллеров (M±m)

Показатели	Активирующий агент	Группа I	Группа II	Контроль
Суммарное содержание CD8+Pr+ и CD16+Pr+ лимфоцитов, %	-	22,3±2,4 ²⁾	12,2±1,1 ^{1,2)}	24,1±5,1
	Не стимулированные моноциты	26,9±3,2 ²⁾	14,5±1,5 ^{1,2)}	27,3±4,7
	ВПП-стимулированные моноциты	34,2±2,1 ²⁾	25,3±2,7 ^{1,2)}	38,4±6,2
Суммарное содержание CD8+ и CD16+ лимфоцитов, %	-	59,6±2,4 ^{1,2)}	32,7±2,8 ^{1,2)}	45,7±3,9

Примечание: ¹⁾ – различия достоверны при сравнении с контрольной группой ($p < 0,05$); ²⁾ – различия достоверны при сравнении групп I и II ($p < 0,05$).

ЛИТЕРАТУРА

1. Баскакова Д.В., Халдин А.А., Бирко Н.И. Клинико-эпидемиологические характеристики заболеваний, вызванных герпесом простого герпеса // Российский журнал кожных и венерических болезней. Приложение «Герпес». – 2006. – № 2. – С. 26-30.
2. Баринский И.Ф., Алимбарова Л.М., Шмелев В.А., Платонова А.А. Противовирусная активность рекомбинантного интерферона-гамма человека и рекомбинантного гибридного белка альфа-фактор некроза опухолей-тимозин-альфа1 на моделях герпес-вирусной и цитомегаловирусной инфекции *in vitro* // Вопросы вирусологии. – 2004. – № 5. – С. 37-43.
3. Борунова А.А., Чкадуа Г.З., Заботина Т.Н., Кадагидзе З.Г. Перфориновый потенциал эффекторных клеток у онкологических больных // Вестн. РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2005. – № 3-4. – С. 7-9.
4. Сидоренко С.П. Поверхностные антигены клеток человека, систематизированные международными рабочими совещаниями по дифференцировочным антигена лейкоцитов человека // Имунология та алергология. – 1998. – № 3. – С. 16-38.
5. Халдин А.А., Львов А.Н. Алгоритм ведения больных с рецидивирующим простым герпесом // Эффективная фармакотерапия. Дерматовенерология и дерматокосметология. – 2011. – № 2. – С. 10-13, 59.
6. Aldreiwish A. The effect of HSV-1 Infection on Differentiated and Polarized U937 Cells. – USA : Wright State University, 2013. – 71 p.
7. Groscurth P., Filgueira L. Killing mechanisms of cytotoxic T lymphocytes // News Physiol. Sci. – 1998. – Vol. 13, N 3. – P. 156-162.
8. Lund J.M., Hsing L., Pham T.T., Rudensky A.Y. Coordination of early protective immunity to viral infection by regulatory T cells // Science. – 2008. – Vol. 320, N 5880. – P. 1220-1224.
9. MACPF/CDC Proteins – Agents of Defence, Attack and Invasion. Subcellular Biochemistry 80 / Eds. Anderlueh G., Gilbert R. – Netherlands : Springer Science+Business Media Dordrecht. – 2014. – 322 p.
10. Melchjorsen J., Matikainen S., Paludan S.R. Activation and evasion of innate antiviral immunity by herpes simplex virus // Viruses. – 2009. – Vol. 1, N 3. – P. 737-759.