

Особливості фенотипування лімфоцитів у хворих з активованою рецидивуючою герпетичною інфекцією першого/другого типу та порушенням репродукції

For cite: Mezhdunarodnyi Endokrinologicheskii Zhurnal. 2017;13:61-5. doi: 10.22141/2224-0721.13.1.2017.96759

Резюме. Метою дослідження був аналіз особливостей змін субпопуляції лімфоцитів за даними імунограми у хворих із рецидивуючою герпетичною інфекцією та репродуктивними порушеннями. **Матеріали та методи.** Вивчено особливості фенотипування лімфоцитів у 120 хворих з активованою рецидивуючою герпетичною інфекцією першого/другого типу (ВПГ 1/2), серед яких у 63 пацієнтів була діагностована безплідність. **Результати.** Виявлено збільшення рівня кілерних клітин: CD16⁺/56⁺ (NK-клітин) при помірно рецидивуючій інфекції (1–5 рецидивів протягом року) та CD3⁺/8⁺ (Т-супресорів/кілерів) при часто рецидивуючій інфекції (6 і більше рецидивів протягом року). **Висновки.** У безплідних хворих із рецидивуючою інфекцією ВПГ 1/2 спостерігався дефіцит клітин із супресорною активністю: CD4⁺CD25⁺CD127⁻-лімфоцитів (регуляторних Т-клітин) та CD3⁺/8⁺-лімфоцитів (Т-супресорів/кілерів).

Ключові слова: простий герпес; рецидив; безплідність

Вступ

При інфікуванні організму вірусом простого герпесу (ВПГ) захисну роль відіграють різноманітні специфічні та неспецифічні гуморальні й клітинні фактори імунітету, пов'язані з кооперацією віруснейтралізуючих антитіл, макрофагів, інтерферону, лейкоцитів та лімфоцитів [6]. Лімфоцити — головні клітини імунної системи, що координують і здійснюють імунну відповідь внаслідок продукування запальних цитокінів, відповідають за формування специфічного імунітету, здійснюють функцію імунного нагляду в організмі, забезпечують захист від усього чужорідного, зберігаючи генетичну сталість внутрішнього середовища [7, 17, 20, 21].

Рецидивуюча герпетична інфекція, особливо з маніфестацією на шкірі та слизових оболонках, є одним з найбільш поширених видів герпетичної інфекції, спричиненої вірусом простого герпесу першого та другого типів (ВПГ 1/2) [2, 4]. Більш тяжкі форми пов'язані з ураженням очей, геніталій, внутрішніх органів і центральної нервової системи [8, 13].

Існує все більше доказів того, що вірусні інфекції відіграють певну роль у патогенезі жіночої і чолові-

чої безплідності [14]. Численні дані клінічних спостережень свідчать про те, що хронічна герпетична інфекція є одним із факторів зниження репродуктивних можливостей як жіночого, так і чоловічого організму фертильного віку [9]. Простий герпес 1-го типу виявлений у 29 % обстежених жінок з безплідністю, а 2-го — у 34 %. У патологічний процес втягується передміхурова залоза та яєчки в чоловіків, маткові труби в жінок, що може спричинити безплідність [14].

У наш час недостатньо вивчені імунологічні механізми реактивації герпетичної інфекції, що лежать в основі рецидивування захворювання [1]. Використання в клінічній практиці методів оцінки імунного статусу хворих з різноманітними проявами герпетичної патології виявило в них імунологічні порушення, що відіграють суттєву роль у персистенції вірусу та патогенезі рецидивуючого простого герпесу. Відомо, що при порушеннях імунного статусу герпетична інфекція набуває більш тяжкого перебігу з частими та тривалими рецидивами, що пов'язано з недостатністю імунітету або з надмірною імунною реакцією [16, 22].

Відсутність повної елімінації вірусу простого герпесу з організму сприяє серйозним порушенням імунітету, результатом яких при рецидивуючій формі активованої герпетичної інфекції є зміни функціональної активності та загальної кількості лімфоцитів, зміни в системі інтерферону, макрофально-клітинній ланці [5, 12, 15, 18].

Глибокий аналіз стану клітинного імунітету у хворих на рецидивуючий герпес дозволив зробити висновок про неповноцінність цієї ланки імунітету у період як рецидиву, так і ремісії [19]. Це є відзеркаленням вторинного імунного дефіциту. Отже, при рецидивуючому герпесі в першу чергу страждає клітинний імунітет. Проте чи впливає глибина порушень у клітинному імунітеті хворих на частоту рецидивів ВПГ 1/2, поки остаточно не з'ясовано.

Патогенетичні аспекти безплідності, зумовлені імунологічними факторами, все ще не до кінця виявлені. Тому **метою нашого дослідження** був аналіз особливостей змін субпопуляції лімфоцитів за даними імунограми у хворих з рецидивуючою інфекцією ВПГ 1/2 та репродуктивними порушеннями.

Отримані результати досліджень допоможуть розкрити взаємозв'язок між рецидивуючою герпетичною інфекцією та імунними порушеннями у хворих за умов безплідності, частково визначити причини, що її зумовлюють.

Матеріали та методи

Проведено проспективне дослідження 120 хворих віком до 35 років і понад 50 років, з верифікованим діагнозом «рецидивуючий простий герпес» та наявністю рецидиву герпетичної інфекції протягом останнього місяця. Верифікація діагнозу здійснювалася на підставі клінічної картини рецидивуючої герпетичної інфекції, даних анамнезу, лабораторних критеріїв (полімеразна ланцюгова реакція: визначали кількість фрагментів ДНК ВПГ 1/2 у крові; серологічна діагностика: виявляли антитіла IgM ВПГ 1/2 та IgG ВПГ 1/2 у сироватці крові). Контрольну групу становили 20 практично здорових осіб відповідного віку. Критеріями включення в контрольну групу були: відсутність симптомів і маніфестації герпетичної інфекції протягом принаймні останнього року; відсутність гострих інфекцій протягом принаймні одного місяця до моменту взяття крові; відсутність хронічних запальних і аутоімунних захворювань. Додатково у даної групи осіб контролювався рівень IgM ВПГ 1/2 та IgG ВПГ 1/2 у сироватці крові для виключення прихованого безсимптомного перебігу хронічної герпетичної інфекції.

Хворі були розподілені на дві групи: за частотою рецидивів (83 хворі з помірно рецидивуючою інфекцією ВПГ 1/2 і 37 хворих з часто рецидивуючою інфекцією ВПГ 1/2) та репродуктивною здатністю (63 плідних і 57 безплідних).

Фенотипування лімфоцитів проводили із застосуванням методу проточної цитофлюориметрії. Для дослідження використовували антитіла CD3-FITC/CD22-PE, CD3-FITC/CD4-PE, CD3-FITC/CD8-PE, CD3-FITC/CD (16+56)-PE,

CD4-FITC (Becton Dickinson Immunocytometry Systems), CD25-PE (Dako Cytomation), CD25-PC5, CD127-PE (Beckman Coulter); розчини для лізису еритроцитів, фіксації лейкоцитів (Becton Dickinson Immunocytometry Systems); для фіксації і забарвлення клітин (eBioscience). Забарвлення клітин антитілами до поверхневих і внутрішньоклітинних антигенів проводили відповідно до протоколів виробників. Аналіз зв'язування антитіл з клітинами виконували на проточному цитофлюориметрі FACS Calibur (Becton Dickinson, США) з використанням програмного забезпечення Cell Quest (Becton Dickinson Immunocytometry Systems). Лімфоцити виділяли за параметрами прямого і бокового світлорозсіювання. Активовані ефекторні Т-лімфоцити типували як регуляторні Т-лімфоцити — CD4⁺CD25^{br/>neg}CD 127^{neg} [11] відповідно до міжнародних рекомендацій.

Імунологічні показники оцінювали за абсолютною і відносною їх кількістю у венозній крові хворих.

Статистична обробка отриманих результатів досліджень проводилася з використанням загальноприйнятих методів варіаційної статистики за допомогою пакета статистичних програм Excel 2002 та Statistika for Windows (Statsoft Ins, США) [10]. Рівень вірогідності визначали за критерієм Стьюдента [3].

Результати

Проведений аналіз результатів фенотипування лімфоцитів у хворих із різною частотою рецидивів інфекції ВПГ 1/2 показав збільшення рівня кілерних клітин — CD16⁺/56⁺ (NK-клітин) у відносних (26,3 ± 2,32 %; P < 0,05) та абсолютних значеннях (0,52 ± 0,09 г/л; P < 0,01) порівняно з контрольною групою при помірно рецидивуючій інфекції (1–5 рецидивів протягом року) даного вірусу (табл. 1).

Зростання пулу інших кілерних клітин — CD3⁺/8⁺ (Т-супресорів/кілерів) у відносних (32,8 ± 2,73 %; P < 0,01) і абсолютних значеннях (0,59 ± 0,09 г/л; P < 0,01) порівняно з контрольною групою спостерігалось у хворих із частими рецидивами інфекції ВПГ 1/2 (6 і більше рецидивів протягом року) даного вірусу. Порівняння рівня CD3⁺/8⁺ клітин у хворих із помірним і частим рецидивуванням ВПГ 1/2 також виявило вірогідне збільшення кількості цих клітин у хворих із частими рецидивами цієї інфекції.

Обговорення

Аналіз субпопуляційного складу лімфоцитів плідних і безплідних хворих з рецидивуючою інфекцією ВПГ 1/2 показав (табл. 2), що рівень CD16⁺/56⁺ (NK-клітин) був підвищений у відносних (25,8 ± 2,75 %; P < 0,05), а найбільше — в абсолютних значеннях (0,50 ± 0,08 г/л; P < 0,01) порівняно з контрольною групою у плідних хворих. У безплідних хворих була вірогідно збільшена кількість CD3⁺/8⁺ (Т-супресорів/кілерів) у відносних (29,8 ± 2,19 %; P < 0,05) і абсолютних значеннях (0,64 ± 0,09 г/л; P < 0,01) порівняно з контрольною

групою і з плідними хворими ($P < 0,05$). Перебіг рецидивуючої інфекції ВПГ 1/2 супроводжувався незначним збільшенням відносних значень Т-хелперів/індукторів ($CD3^+/4^+$) до рівня $31,5 \pm 2,56\%$ ($P < 0,05$) у безплідних хворих порівняно з плідними.

Отримані дані можуть свідчити про дисфункцію імунної системи у безплідних хворих, на існування якої при рецидивах герпетичної інфекції і вказують ряд авторів [1, 16, 22].

У хворих із безплідністю спостерігалось зменшення абсолютної кількості регуляторних Т-клітин — $CD4^+CD25^+CD127^-$ -лімфоцитів ($0,02 \pm 0,010$ г/л; $P < 0,05$) порівняно з контрольною групою. Рівень цих клітин був також вірогідно нижчим у безплідних хворих порівняно з плідними ($P < 0,05$). Зниження рівня $CD4^+CD25^+CD127^-$ -лімфоцитів у безплідних хворих вказує на послаблення супресорної активності цих клітин та можливу участь у формуванні безплідності.

Таблиця 1. Показники субпопуляційного складу лімфоцитів у хворих з активованою рецидивуючою герпетичною інфекцією першого/другого типу з урахуванням частоти рецидивів ($M \pm m$)

Показники	Одиниця виміру	Здорові (n = 20)	Хворі (n = 120), кількість рецидивів за рік	
			1–5 (n = 83)	6 і більше (n = 37)
			1	2
CD16 ⁺ /56 ⁺ -лімфоцити	%	18,80 ± 2,09	26,30 ± 2,32*	23,00 ± 2,81
	Г/л	0,32 ± 0,04	0,52 ± 0,09**	0,40 ± 0,05
CD22 ⁺ -лімфоцити	%	22,80 ± 2,08	25,30 ± 3,58	24,80 ± 3,37
	Г/л	0,39 ± 0,08	0,52 ± 0,09	0,44 ± 0,08
CD3 ⁺ -лімфоцити	%	69,50 ± 6,03	66,80 ± 5,03	69,10 ± 6,40
	Г/л	1,13 ± 0,25	1,41 ± 0,50	1,22 ± 0,39
CD3 ⁺ /4 ⁺ -лімфоцити	%	26,10 ± 3,82	30,00 ± 3,05	28,00 ± 2,38
	Г/л	0,45 ± 0,11	0,60 ± 0,12	0,49 ± 0,10
CD3 ⁺ /8 ⁺ -лімфоцити	%	20,00 ± 3,45	25,20 ± 2,14	32,80 ± 2,73**^
	Г/л	0,34 ± 0,05	0,42 ± 0,06	0,59 ± 0,09**^
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ -лімфоцити	%	2,93 ± 0,90	2,23 ± 0,80	3,26 ± 0,99
	Г/л	0,05 ± 0,01	0,040 ± 0,005	0,060 ± 0,009^

Примітки: * — $P < 0,05$; ** — $P < 0,01$ (вірогідна різниця порівняно з контролем); ^ — $P < 0,05$ (вірогідна різниця між групами хворих).

Таблиця 2. Показники субпопуляційного складу лімфоцитів у хворих з активованою рецидивуючою герпетичною інфекцією першого/другого типу з урахуванням плідності ($M \pm m$)

Показники	Одиниця виміру	Здорові (n = 20)	Хворі (n = 120)	
			Плідність (n = 63)	Безплідність (n = 57)
			1	2
CD16 ⁺ /56 ⁺ -лімфоцити	%	18,80 ± 2,09	25,80 ± 2,75*	20,20 ± 1,89^
	Г/л	0,32 ± 0,04	0,50 ± 0,08**	0,37 ± 0,06
CD22 ⁺ -лімфоцити	%	22,80 ± 2,08	22,10 ± 3,64	26,80 ± 2,95
	Г/л	0,39 ± 0,08	0,35 ± 0,08	0,52 ± 0,09
CD3 ⁺ -лімфоцити	%	69,50 ± 6,03	69,80 ± 5,05	65,50 ± 5,87
	Г/л	1,13 ± 0,25	1,49 ± 0,45	1,19 ± 0,34
CD3 ⁺ /4 ⁺ -лімфоцити	%	26,10 ± 3,82	25,90 ± 2,24	31,50 ± 2,56^
	Г/л	0,45 ± 0,11	0,41 ± 0,13	0,57 ± 0,11
CD3 ⁺ /8 ⁺ -лімфоцити	%	20,00 ± 3,45	23,10 ± 3,04	29,80 ± 2,19*^
	Г/л	0,34 ± 0,05	0,36 ± 0,06	0,64 ± 0,09**^
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ -лімфоцити	%	2,93 ± 0,90	3,56 ± 1,16	1,23 ± 0,90^
	Г/л	0,05 ± 0,01	0,060 ± 0,007	0,020 ± 0,010*^

Примітки: * — $P < 0,05$; ** — $P < 0,01$ (вірогідна різниця порівняно з контролем); ^ — $P < 0,05$ (вірогідна різниця між групами хворих).

Висновки

Рецидивуюча інфекція ВПГ 1/2 супроводжується збільшенням рівня кілерних клітин: помірно рецидивуюча (1–5 рецидивів протягом року) — CD16⁺/56⁺ (NK-клітин), часто рецидивуюча (6 і більше рецидивів протягом року) — CD3⁺/8⁺ (Т-супресорів/кілерів).

У безплідних хворих із рецидивуючою інфекцією ВПГ 1/2 спостерігається дефіцит клітин із супресорною активністю: CD4⁺CD25⁺CD127⁻-лімфоцитів (регуляторних Т-клітин) та CD3⁺/8⁺-лімфоцитів (Т-супресорів/кілерів).

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів при підготовці даної статті.

References

1. Ambalov M, Ryazanov A, Kovalenko AP. Method of design of relapses of disease in patients by a simple herpes and its nosotropic ground. *Cytokines and Inflammation*. 2012;11(3):52-53 (Russian).
2. Bondarev LS, Zaplotnaya AA, Sotnik YP. Herpes and viral infection — a modern look to the problem. *Vestnik neotlozhnoy i vosstanovitelnoy mediciny*. 2006;7(3):473-478 (Russian).
3. Hlants C. *Meditainskaia i biologicheskaja statistika [Medical and biological statistics]*. Moscow: Practice; 1998. 459 p. (Russian).
4. Drannyk GN, Sydro EV. Infections caused by herpes simplex virus. *Zdorov'ja Ukrainy*. 2007;2, 24-25 (Russian).
5. Zheleznyakova GF. Regulator T-lymphocytes in immune answer for an infection. *Zhurnal ynfektolohy*. 2011;3(1):6-12 (Russian).
6. Zlotnykova MV. Mechanisms of natural and adaptive immunity at the infections caused by the viruses of simple herpes 1 and 2 types. *Problemy zdorov'ia i ekologii*. 2014;1:7-14 (Russian).
7. Servetskiy L, Shepherd T, Oliynyk AG, Nikitin AE. Changes in indicators of cellular immunity in patients with herpes infection. *Materials of VIII Ukrainian congress of infectious disease*. Vinnytsia, 2010; 107 s. (Ukrainian).
8. Mardanly SG, Kirpichnikova GI, Neverov VA. Herpes infection (Simple herpes). *Elektrohorsk: ZAO EKOLab*, 2010; 56 s. (Russian).

9. Naumenko VA, Bush AA. Herpes virus and masculine sterility: is there connection? *Voprosy virusologii*. 2013;58(3):4-9 (Russian).

10. Rebrov O. *Statistical analysis of medical results. Application of package program STATISTICA*. M.: Medyasfera, 2002; 312 s. (Russian).

11. Selyutyn A, Selkov SA. Methods of determination of maintenance of T-regulatory cages in peripheral blood. *Terra medica*. 2008;4:19-21 (Russian).

12. Freydlin IS. Immune system and antiviral immunities, questions of the general virology. *SPb: SPbGMA of I. Mechanik*, 2007; 65-129 (Russian).

13. Cherkasov V. Herpes infection: clinical and immunological and psychosomatic features. *Ukrains'kyj medychnyj al'manah*. 2011;14(1):221-223 (Ukrainian).

14. Monavari SH, Vaziri MS, Khalili M. et al. Asymptomatic seminal infection of herpes simplex virus: impact on male infertility. *J Biomed Res*. 2013;27(1):56-61.

15. Forbes LR, Paessler M, Orange JS. CD16 deficiency discovered in a cohort of patients with severe herpesviral infections using a new diagnostic test. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123(2):67.

16. Grinde B. Herpesviruses: latency and reactivation — viral strategies and host response. *J Oral Microbiol*. 2013;5:4-10.

17. Su H, Longhi MS, Wang P. Human CD4⁺CD25^(high)CD127^(low/neg) regulatory T cells. *Methods Mol Biol*. 2012;806:287-299.

18. Retamal-Díaz AR, Suazo PA, Garrido I et al. Immune evasion by herpes simplex virus. *Rev Chil Infectol*. 2015;32(1):58-71.

19. Bennett JM, Glaser R, Malarkey WB et al. Inflammation and reactivation of latent herpesviruses in older adults. *Brain Behav Immun*. 2012;26(5):739-746.

20. Nandakumar S, Woolard SN, Yuan D et al. Natural killer cells as novel helpers in anti-herpes simplex virus immune response. *J Virol*. 2008;82(21):10820-10831.

21. Ralainirina N, Poli A, Michel T. Control of NK cell functions by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Leukoc Biol*. 2007;81(1):144-153.

22. Roizman B, Knipe DM, Whitley R. Herpes Simplex Viruses. In book: *Fields Virology*, 5th ed. by D. Knipe, P. Howley. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins; 2007. 2502-2601.

Отримано 24.01.2017 ■

Шмыга Т.В., Гаевская В.Ю., Гаевский В.Ю.

Львовский национальный медицинский университет им. Данила Галицкого, г. Львов, Украина

Особенности фенотипирования лимфоцитов у больных с активированной рецидивирующей герпетической инфекцией первого/второго типа и нарушением репродукции

Резюме. Целью исследования был анализ особенностей изменений субпопуляции лимфоцитов по данным иммунограммы у больных с рецидивирующей герпетической инфекцией и репродуктивными нарушениями. **Материалы и методы.** Изучены особенности фенотипирования лимфоцитов у 120 больных с активированной рецидивирующей герпетической инфекцией первого/второго типа (ВПГ 1/2), среди которых у 63 пациентов было диагностировано бесплодие. **Результаты.** Выявлено увеличение уровня киллерных клеток: CD16⁺/56⁺

(NK-клеток) при умеренно рецидивирующей инфекции (1–5 рецидивов в течение года) и CD3⁺/8⁺ (Т-супресор/киллеров) при часто рецидивирующей инфекции (6 и более эпизодов в течение года). **Выводы.** У бесплодных больных с рецидивирующей инфекцией ВПГ 1/2 наблюдался дефицит клеток с супресорной активностью: CD4⁺CD25⁺CD127⁻-лимфоцитов (регуляторных Т-клеток) и CD3⁺/8⁺-лимфоцитов (Т-супресор/киллеров).

Ключевые слова: простой герпес; рецидив; бесплодие

T.V. Shmyga, V.Yu. Gayevska, V.Yu. Gayevskiy
Danylo Halytskyi Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

Features of lymphocyte phenotyping in patients with activated recurrent herpetic infection of the first/second type and reproductive system disorders

Abstract. *The aim* of the study was an analysis of the features of changes in lymphocyte subpopulation according to the data of immunography in patients with a recrudescing herpetic infection and reproductive violations. **Materials and methods.** The peculiarities of lymphocyte phenotyping were studied in 120 patients with activated recurrent herpetic infection of the first/second type (herpes simplex virus (HSV) 1/2), among whom 63 patients were diagnosed with infertility. **Results.** An increase in the level of killer cells was detected: CD16⁺/56⁺

(NK-cells) — in moderately recurrent infection (1–5 relapses within one year) and CD3⁺/8⁺ (T-suppressor/killer cells) — in frequently recurrent infection (6 or more episodes during the year). **Conclusions.** In infertile patients with recurrent HSV 1/2 infection, there has been observed a deficit of cells with suppressive activity: CD4⁺CD25⁺CD127⁻ (regulatory T-cells) lymphocytes and CD3⁺/8⁺ (T-suppressor/killer cells) lymphocytes.

Keywords: herpes simplex; relapse; infertility