

## ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО РЕАГИРОВАНИЯ У ДЕТЕЙ С РЕКУРРЕНТНЫМИ РЕСПИРАТОРНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ, ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИРУСОМ ЭПШТЕЙНА-БАРР

Соловьева И.Л.<sup>1</sup>, Шалунова Л.А.<sup>1</sup>, Соловьева А.А.<sup>1</sup>, Галич Е.Н.<sup>1</sup>, Полетаева Е.В.<sup>1</sup>, Мехтиева С.Д.<sup>1</sup>, Бергельсон Т.М.<sup>1</sup>, Полушкин А.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», Ульяновск, e-mail: medicwitch@yandex.ru

Вирус Эпштейна-Барр убиквитарен, им инфицировано примерно 95% населения планеты. Контакт с вирусом происходит в раннем детском возрасте, обычно проходит без выраженных клинических проявлений, при этом человек становится вирусоносителем на всю жизнь. ВЭБ-инфекция является патогенетическим фоном, который формирует контингент детей с рекуррентными респираторными заболеваниями (РРЗ) и может способствовать развитию иммунологической недостаточности. Сравнительный анализ проводился между двумя группами детей, которые имели маркеры персистирующей инфекции ВЭБ: у детей, которые в анамнезе имели рекуррентные респираторные заболевания, и у группы детей без РРЗ. В ходе исследования гуморального иммунитета не выявлено изменений IgA, IgM, IgG в группах сравнения. Однако выявлено достоверно значимое увеличение содержания CD19+CD3- у детей старшего возраста с РРЗ. У детей с рекуррентными заболеваниями, инфицированных ВЭБ, в обеих возрастных группах зарегистрировано достоверно значимое увеличение абсолютных значений CD3+CD4+CD19-, CD3+CD8+CD19-, CD3+CD16+CD56+ лимфоцитов по сравнению с редко болеющими. Достоверных различий в содержании CD23+CD19+ и CD25+CD3+ в группах сравнения не выявлено. У детей школьного возраста с рекуррентными респираторными заболеваниями, инфицированных ВЭБ, отмечено напряжение компенсаторных реакций иммунной системы в виде повышения ряда показателей Т-клеточного и гуморального иммунитета. Повышенный уровень Т-NK клеток у детей с рекуррентными респираторными заболеваниями в обеих возрастных группах может свидетельствовать о наличии вирусной инфекции и возможном риске хронизации инфекции ВЭБ. Дополнительное исследование лимфоцитов с фенотипом CD23+ CD19+ и CD25+CD3+ позволило показать, что, несмотря на длительную персистенцию ВЭБ у детей с рекуррентными заболеваниями, отсутствуют ранние маркеры активации инфекционного процесса.

Ключевые слова: дети, рекуррентные респираторные заболевания, Эпштейна-Барр вирус, гуморальный, клеточный иммунитет.

## THE PECULIARITIES OF IMMUNE RESPONSE IN CHILDREN WITH RECURRENT RESPIRATORY DISEASES, INFECTED WITH THE VIRUS EPSTEIN-BARR.

Soloveva I.L.<sup>1</sup>, Shalunova L.A.<sup>1</sup>, Soloveva A.A.<sup>1</sup>, Galich E.N.<sup>1</sup>, Poletaeva E.V.<sup>1</sup>, Mekhtieva S.D.<sup>1</sup>, Bergelson T.M.<sup>1</sup>, Polushkin A.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> FGBOU VO «Ulyanovsk State University», Ulyanovsk, e-mail: medicwitch@yandex.ru

Epstein-Barr virus is ubiquitous, about 95% of the world's population is infected. Contact with the virus occurs in early childhood, usually passes without pronounced clinical manifestations, and the person becomes a virus carrier for life. EBV infection is a pathogenetic background that forms a contingent of children with recurrent respiratory diseases (RRD) and may contribute to the development of immunological failure. A comparative analysis was carried out between two groups of children who had markers of persistent EBV infection in children who had a history of recurrent respiratory diseases and a group of children without RRH. The study of humoral immunity revealed no changes in IgA, IgM, IgG in the comparison groups. However, a significantly significant increase in the content of CD19 + CD3- in older children with RRH was found. In children with recurrent diseases of EBV infected in both age groups, a significantly significant increase in the absolute values of CD3 + CD4 + CD19-, CD3 + CD8 + CD19-, CD3 + CD16 + CD56 + lymphocytes was registered in comparison with the rarely ill. Significant differences in the content of CD23 + CD19 + and CD25 + CD3 + in the comparison groups were not found. School-age children with recurrent respiratory diseases infected with EBV have been marked by the stress of compensatory reactions of the immune system, in the form of an increase in a number of T-cell and humoral immunity indicators. Elevated levels of T-NK cells in children with recurrent respiratory diseases in both age groups may indicate the presence of a viral infection and the possible risk of chronic EBV infection. An additional study of lymphocytes with the phenotype CD23 + CD19 + and CD25 + CD3 + allowed us to show that despite the long-term persistence of EBV in children with recurrent diseases, there are no early markers of the activation of the infectious process.

Keywords: children, recurrent respiratory diseases, Epstein-Barr virus, humoral, cellular immunity.

Широкая циркуляция герпетических вирусов среди населения, увеличение заболеваемости, связанной с вирусами группы герпес, обуславливает актуальность изучения данной проблемы, в том числе и среди детского населения. В настоящий момент зарегистрировано 8 типов возбудителей группы герпес-вирусов, в эту группу входит и вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ). Согласно данным Международного комитета по таксономии вирусов, ВЭБ относится к семейству Herpesviridae, подсемейству Gammaherpesvirinae, роду Lymphocryptovirus, виду Human herpesvirus [1]. Геном ВЭБ представляет собой двуспиральную молекулу ДНК длиной около 172 тыс. пар нуклеотидов. По своим свойствам вирус Эпштейна-Барр мало отличается от других представителей семейства вирусов герпеса, но его особенность обусловлена способностью вызывать не цитолиз пораженных клеток, а размножение в инфицированных В-лимфоцитах, при этом геном ВЭБ обнаруживается и в Т-лимфоцитах [2; 3]. Оказалось, что ВЭБ убиквитарен, им инфицировано примерно 95% населения планеты. Контакт с вирусом происходит в раннем детском возрасте, обычно проходит без выраженных клинических проявлений, при этом человек становится вирусоносителем на всю жизнь. При более позднем инфицировании вирус Эпштейна-Барр способен вызывать инфекционный мононуклеоз, характеризующийся пролиферацией Т-лимфоцитов, вирус одновременно является лидером по числу ассоциированных с ним различных доброкачественных и злокачественных новообразований лимфоидного и эпителиального происхождения [2]. Персистенция возбудителя в ряде случаев приводит к возникновению иммунной недостаточности, ВЭБ-инфекция является патогенетическим фоном, который формирует контингент «часто болеющих детей - ЧБД» [4; 5]. Однако в настоящий момент термин «часто болеющие дети» не используется и заменен на термин «дети с рекуррентными респираторными заболеваниями», поскольку ЧБД – это не диагноз, и в целом таких детей следует относить ко II диспансерной группе наблюдения [6; 7]. В данной группе с высокой частотой обнаруживаются маркеры герпетической инфекции, преимущественно в ассоциации с цитомегаловирусом, ВЭБ, вирусом герпеса человека 6 типа [8]. Иммунологические изменения при ВЭБ-инфекции носят разнонаправленный характер и зависят от ряда факторов, в том числе от стадии, периода инфекционного процесса, степени тяжести [9; 10].

Цель: изучить особенности иммунного реагирования у детей с рекуррентными респираторными заболеваниями, инфицированных вирусом Эпштейна-Барр.

#### **Материал и методы исследования**

В ходе исследования под наблюдением находилось 72 ребенка, инфицированных Эпштейна-Барр вирусом, имеющих маркеры активной репликации. Критерии включения:

- возраст от 3 до 15 лет;
- дети на момент обследования не должны иметь острых, а также обострений хронических заболеваний.

Проведение иммунологических исследований планировалось проводить не ранее, чем через 1 месяц после последнего эпизода острой респираторной инфекции. На исследование было получено заключение этического комитета. Собранный анамнез позволил определить клиническую характеристику групп. В группу детей с рекуррентными респираторными заболеваниями были включены те дети, которые в течение года переносили от 6 до 14 эпизодов острых респираторных заболеваний. Среди острой респираторной патологии у детей в этой группе чаще всего регистрировались в 72,2% случаев острые назофарингиты. Помимо этого, в 38,9% случаях отмечались риниты, в 22,3% случаев дети переносили ларингиты или ларинготрахеиты, риносинуситы в 16,7% случаев, рецидивирующие острые бронхиты были отмечены в 27,8% случаев, внебольничные пневмонии встречались у 19,4% пациентов, практически половина (44,4%) детей имели различной степени гипертрофию аденоидов. В группе детей с персистирующей ВЭБ-инфекцией, которые эпизодически переносили острые респираторные заболевания не чаще 3-4 раз в течение года, в основном были зарегистрированы острые назофарингиты (в 80,1% случаев) или риниты (55,6%), редко ларингиты (в 16,7% случаев), протекавших легко и не требовавшие госпитализации.

Все они были разделены на 2 группы:

1 группа (31 человек) – дети с рекуррентными респираторными заболеваниями, которые были дополнительно разделены на подгруппы:

- 1А (18 человек) – дети дошкольного возраста, инфицированные ВЭБ, с рекуррентными респираторными заболеваниями;

- 1Б (13 человек) – дети школьного возраста, инфицированные ВЭБ, с рекуррентными респираторными заболеваниями;

2 группа (41 человек) – дети, редко болеющие респираторными заболеваниями, где также выделены подгруппы:

- 2А (12 человек) – дети дошкольного возраста, инфицированные ВЭБ, с эпизодическими респираторными заболеваниями;

- 2Б (29 человек) – дети школьного возраста, инфицированные ВЭБ, с эпизодическими респираторными заболеваниями.

Для серологического подтверждения персистенции ВЭБ определяли антитела к вирусным капсидным антигенам (VCA), ранним антигенам (EA), нуклеарному (или

ядерному) антигену (EBNA-1) методом ИФА с помощью реагентов «Вектор-Бест». Всем детям было проведено определение уровня общих IgA, IgM, IgG (г/л) методом ИФА, на анализаторе Immuno Chem – 2100 (HTI, США). Иммунофенотипирование лимфоцитов исследовано на мультилазерной диагностической системе проточной многоцветной цитофлуометрии CyFlow Space (Partec GmbH, Германия): Т-лимфоциты (CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>), Т-хелперы/индукторы (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD19<sup>-</sup>), Т-цитотоксические лимфоциты (Т-ЦТЛ) (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>), Т-NK-лимфоциты с фенотипом (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>), В-лимфоциты (CD19<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>), (CD23<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>) активированные Т-лимфоциты, экспрессирующие альфа-цепь рецептора ИЛ-2 (CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>). Полученные результаты подвергались компьютерной обработке с использованием программы Statistica Base for Windows 10, Microsoft Office Excel. Для представления свойств статистической совокупности использовали закон нормальности распределения (распределение Гаусса), поскольку он позволяет обосновать выбор конкретных методов статистического анализа. Проверка нормальности распределения данных производилась визуально по графикам Histograms и Normalprobabilityplots, а также с использованием критерия Колмогорова–Смирнова с поправкой Лиллиефорса и критерия Шапиро–Уилка.

Проверка гипотез о равенстве двух средних производилась с использованием критерия Т-Student. Уровень значимости выражали как  $p < 0,05$ ,  $p < 0,02$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ , либо конкретно указывались значения достигнутого уровня значимости.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

При оценке показателей гуморального и клеточного иммунитета у детей с рекуррентными заболеваниями, инфицированных ВЭБ, выявлен ряд изменений относительно возрастной нормы и группы сравнения.

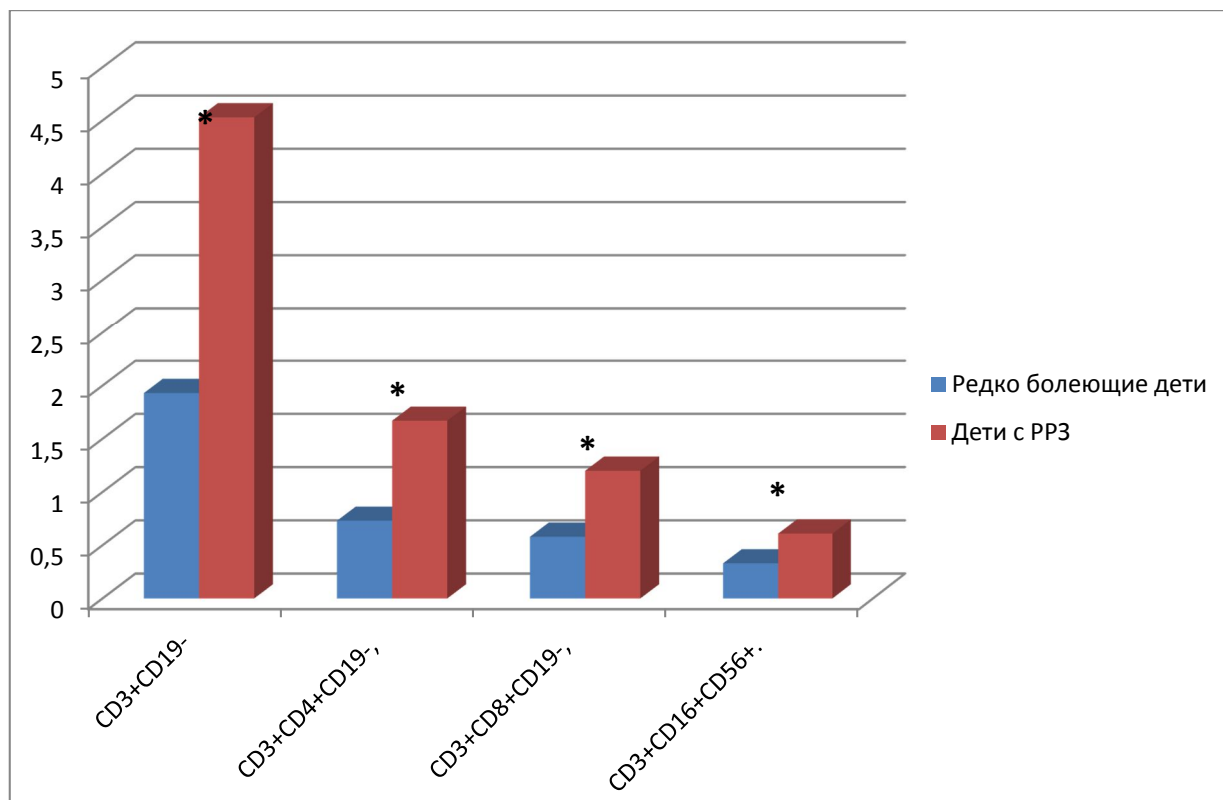
Изучение экспрессии маркера CD19<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> на В-лимфоцитах и сывороточной концентрации основных классов иммуноглобулинов - IgA, IgG и IgM, позволило оценить показатели гуморального звена иммунитета. Было установлено, что в группах сравнения достоверных различий в содержании IgA, IgM и IgG не выявлено ( $p > 0,05$ ). Однако в содержании CD19<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> у детей школьного возраста с рекуррентными респираторными заболеваниями зарегистрировано двукратное увеличение данного показателя в сравнении с группой редко болеющих детей школьного возраста (1Б группа –  $0,42 \cdot 10^9 / л$ , 2Б группа –  $0,20 \cdot 10^9 / л$ ;  $p < 0,0001$ ). При этом лимфоцитоз относительный (1Б группа – 46,89%; 2Б группа – 38,53%  $p < 0,01$ ) и абсолютный (1Б группа –  $3,08 \cdot 10^9 / л$ , 2Б группа –  $2,57 \cdot 10^9 / л$   $p < 0,04$ ) достоверно чаще регистрировался также в группе детей школьного возраста с рекуррентными респираторными заболеваниями. Можно предположить, что относительный и абсолютный лимфоцитоз у детей этих групп обусловлен реактивным лимфоцитозом, так

же как и повышение уровня В-лимфоцитов может быть связано с активностью иммунологических реакций, вызванных более длительной персистенцией вируса Эпштейна-Барр у детей школьного возраста с рекуррентными респираторными заболеваниями. Данный характер изменений отличается от изменений в острой стадии ЭБВ-инфекции [11]. Сравнительный анализ показал, что по уровню относительного и абсолютного содержания лейкоцитов и лимфоцитов достоверных различий в группах сравнения не получено ( $p > 0,05$ ).

Поскольку синтез антител является Т-зависимым процессом, для полной оценки гуморального звена иммунитета необходимо учитывать уровень Т-лимфоцитов ( $CD3^+CD19^-$ ), в том числе Т-хелперов/индукторов ( $CD3^+CD4^+CD19^-$ ).

Оценивая показатели клеточного звена иммунитета, было отмечено достоверно значимое повышение абсолютных значений Т-лимфоцитов ( $CD3^+CD19^-$ ) как у детей дошкольного, так и у детей школьного возраста с рекуррентными респираторными заболеваниями по сравнению с редко болеющими детьми того же возраста (1А группа –  $4,53 \cdot 10^9/\text{л}$ , 2А группа –  $1,93 \cdot 10^9/\text{л}$ ,  $p < 0,001$  и 1Б группа –  $4,27 \cdot 10^9/\text{л}$ , 2Б группа –  $1,83 \cdot 10^9/\text{л}$ ;  $p < 0,0000001$ ).

Аналогичные достоверно значимые изменения в виде повышения уровня абсолютных значений Т-хелперов/индукторов  $CD3^+CD4^+CD19^-$  зарегистрированы в группе детей дошкольного возраста с РРЗ (1А группа –  $1,67 \cdot 10^9/\text{л}$ , 2А группа –  $0,73 \cdot 10^9/\text{л}$ ;  $p < 0,02$ ) и у детей школьного возраста по сравнению с редко болеющими детьми школьного возраста (1Б группа –  $1,10 \cdot 10^9/\text{л}$ , 2Б группа –  $0,66 \cdot 10^9/\text{л}$ ;  $p < 0,003$ ). Т-цитотоксические лимфоциты  $CD3^+CD8^+CD19^-$  были достоверно значимо повышены только в группе детей дошкольного возраста с рекуррентными респираторными заболеваниями по сравнению с редко болеющими детьми, инфицированными ВЭБ (1А группа –  $1,20 \cdot 10^9/\text{л}$ , 2А группа –  $0,58 \cdot 10^9/\text{л}$ ,  $p < 0,04$ ). Сравнение результатов у детей дошкольного возраста представлено на рисунке 1.



*Рис. 1. Изменение клеточного иммунитета у детей дошкольного возраста*

Примечание. Достоверность рассчитана с использованием критерия Т-Student: \* –  $p < 0,05$  в сравнении с группой редко болеющих детей.

Следует отметить, что, по данным ряда авторов, в остром периоде инфекционного мононуклеоза также отмечено повышенное содержание Т-лимфоцитов, Т-хелперов/индукторов, Т-цитотоксических лимфоцитов [10], хотя в других публикациях имеются сведения о снижении этих показателей [9; 11]. Возможно, увеличение ряда показателей клеточного иммунитета может свидетельствовать о напряжении компенсаторных реакций, стимуляции иммунной системы на антиген и служит подтверждением гиперреактивных синдромов у детей с рекуррентными респираторными заболеваниями, имеющих персистенцию ВЭБ.

Для дополнительного исследования с целью выявления изменений иммунной системы при персистирующих инфекциях, требующих оценки степени активности, рекомендуется включать подсчет количества активированных Т-лимфоцитов с фенотипом TNK-клеток с фенотипом CD3+CD16+CD56+. Так, было показано, что абсолютный уровень Т-NK клеток (CD3+CD16+CD56+) у детей дошкольного и школьного возраста достоверно выше в 2 раза в группе детей, инфицированных ВЭБ с РРЗ, по сравнению с редко болеющими детьми, также инфицированными ВЭБ (1А группа –  $0,61 \cdot 10^9/л$ , 2А группа –  $0,33 \cdot 10^9/л$ ,  $p < 0,05$  и 1Б группа –  $0,50 \cdot 10^9/л$ , 2Б группа –  $0,25 \cdot 10^9/л$ ,  $p < 0,0001$ ). Результаты детей школьного возраста проиллюстрированы на рисунке 2.

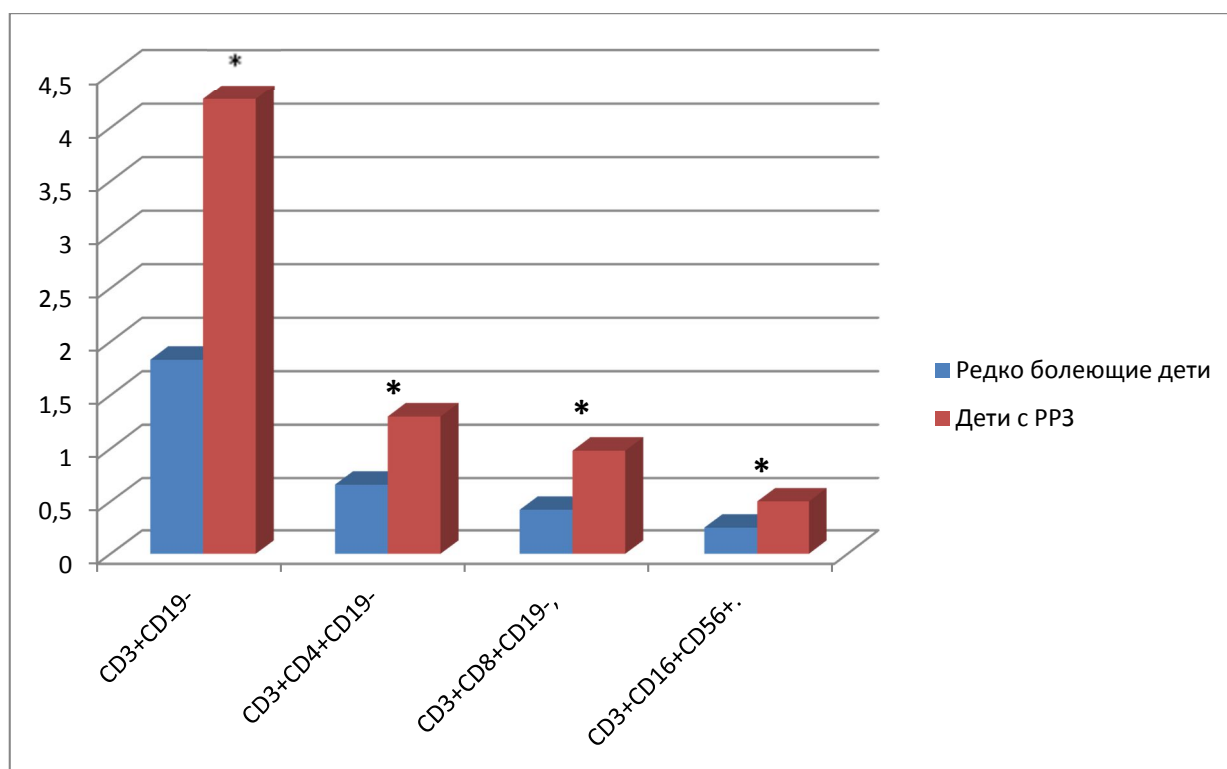


Рис. 2. Изменение клеточного иммунитета у детей школьного возраста

Примечание. Достоверность рассчитана с использованием критерия Т-Student: \* –  $p < 0,05$  в сравнении с группой редко болеющих детей)

Сохраняющийся повышенный уровень Т-NK клеток у детей с рекуррентными респираторными заболеваниями может свидетельствовать о наличии вирусной инфекции в активном состоянии и возможном риске хронизации Эпштейна-Барр вирусной инфекции, поскольку, по литературным данным, повышенный уровень (CD3+CD16+CD56+) регистрируется в острой фазе инфекционного мононуклеоза [9].

При сравнении абсолютных значений CD23+CD19+ у детей в группах сравнения достоверных различий выявлено не было. Известно, что данный антиген, экспрессированный на В-лимфоцитах и ряде других клеток, опосредует рост и созревание зрелых В-клеток, некоторых Т-лимфоцитов. Также он является низкоаффинным рецептором для IgE, FcεRII. Данный антиген индуцирует секрецию клетками провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-1 и ИЛ-6, ФНО, GM-CSF [12]. Так, в нашем исследовании уровень CD23+ CD19+ в группе 1А составил –  $0,04 \cdot 10^9/\text{л}$ , в 2А группе –  $0,06 \cdot 10^9/\text{л}$ ;  $p > 0,05$ . В группах сравнения среди детей школьного возраста, инфицированных ВЭБ, также достоверных различий выявлено не было (в 1Б группе –  $0,05 \cdot 10^9/\text{л}$  и 2Б группе –  $0,03 \cdot 10^9/\text{л}$ ;  $p > 0,05$ ).

Важно было изучить функциональную активность Т-лимфоцитов, и таковая не была изменена у детей с персистенцией вируса Эпштейна-Барр. О функциональном состоянии Т-лимфоцитов свидетельствует количество экспрессирующих рецепторов к ИЛ2 (CD25+).

Поскольку Т-активированные лимфоциты с фенотипом CD25+CD3+, рецептор к ИЛ2, маркер ранней активации Т-лимфоцитов [12]. Проведенный анализ показал, что по содержанию CD25+CD3+ у детей в группах сравнения также достоверных различий выявлено не было (1А группа –  $0,55 \cdot 10^9/\text{л}$ , 2А группа –  $0,60 \cdot 10^9/\text{л}$ ;  $p > 0,05$  и 1Б группа –  $0,004 \cdot 10^9/\text{л}$ , 2Б группа –  $0,019 \cdot 10^9/\text{л}$ ;  $p > 0,05$ ). Проведенные исследования показывают, что в группах сравнения у детей, инфицированных ВЭБ, отсутствуют маркеры активации.

### **Выводы**

- У детей школьного возраста с рекуррентными респираторными заболеваниями, инфицированных вирусом Эпштейна-Барр, отмечено напряжение компенсаторных реакций иммунной системы в виде повышения ряда показателей Т-клеточного иммунитета с фенотипом CD3+CD19-, CD3+CD4+CD19-, CD3+CD8+CD19-, CD3+CD16+CD56+.
- Повышенный уровень Т-НК клеток у детей с рекуррентными респираторными заболеваниями в обеих возрастных группах может свидетельствовать о наличии вирусной инфекции и возможном риске хронизации инфекции ВЭБ.
- Дополнительное исследование лимфоцитов с фенотипом CD23+ CD19+ и CD25+CD3+ позволило показать, что, несмотря на длительную персистенцию ВЭБ, у детей с рекуррентными заболеваниями отсутствуют ранние маркеры активации инфекционного процесса.

### **Список литературы**

1. Галич Е.В., Соловьева А.А., Соловьева И.Л. Изменение уровня интерлейкинов у детей, инфицированных герпес вирусами в течение года // Медикофизиологические проблемы экологии человека: материалы VII Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 30-летию Ульяновского государственного университета. (Ульяновск 19-22 сентября 2018 г.). Ульяновск: Издательский центр Ульяновского государственного университета, 2018. С. 75-78.
2. Гуркевич В.Э. Вирус Эпштейна-Барр и классическая лимфома Ходжкина // Клиническая онкогематология. 2016. № 9(2). С. 101-114.
3. Кусельман А.И., Соловьева И.Л., Черданцев А.П. Герпесвирусные инфекции у детей. Руководство для врачей: Ульяновский Государственный университет, 2017. 280 с.
4. Кан Н.Ю. Значение персистирующей герпесвирусной инфекции в формировании вторичного иммунодефицита у часто болеющих детей // Детские инфекции, 2008. № 7 (2). С. 64-67.
5. Иванова О.Н. Особенности иммунного статуса у детей с инфекцией Вируса-Эпштейн-



Барр // Современные проблемы науки и образования. 2016. № 5. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25255> (дата обращения: 20.05.2019).

6. Захарова И.Н., Торжжоева Л.Б., Заплатников А.Л. Модифицированная интерферонотерапия острых респираторных инфекций у детей раннего возраста: патогенетическое обоснование и эффективность // Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2011. № 3. С. 49-54.

7. Чеботарева Т.А. Дети с рекуррентными инфекциями респираторного тракта: модифицированная интерферонотерапия острых респираторных инфекций // Лечащий врач 2012. № 6. С. 20-23.

8. Мельник О.В. Цитомегаловирусная и Эпштейна-Барр вирусная инфекция у часто болеющих детей с поражением дыхательных путей: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Санкт-Петербург, 2011. 21 с.

9. Ikuta K., Satoh Y., Hoshikawa Y., Sairenji T. Detection of Epstein-Barr virus in salivas and throat washings in healthy adults and children. *Microbes Infect.* 2000. Vol. 2. no 2. P. 115-120.

10. Kasahara Y., Yachie A. Cell type specific infection of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis and chronic active EBV infection. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2002. Vol. 44. no 3. P. 283-294.

11. Ohga S., Nomura A., Takada H. Immunological aspects of Epstein-Barr virus infection. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2002. Vol. 44. no 3. P.203-215.

12. Хайдуков С.В. Основные и малые популяции лимфоцитов периферической крови человека и их нормативные значения (метод многоцветного цитометрического анализа) // Мед. иммунология. 2009. Т. 11 (2-3). С. 227-238.