

УДК 616.98:578.825.13-071-08(047.31)(476)

А. Е. ГОНЧАРОВ¹, Г. М. ДАВИДОВИЧ², И. А. КАРПОВ², Е. В. ДУЖ¹,
И. В. РОМАНОВА¹, Л. П. ТИТОВ¹

ДЕНДРИТНЫЕ КЛЕТКИ, МОНОЦИТЫ И МИЕЛОИДНЫЕ СУПРЕССОРНЫЕ КЛЕТКИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРОЙ ВЭБ-ИНФЕКЦИЕЙ

¹Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь,
e-mail: andrei.hancharou@gmail.com

²Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

В данной работе выполнено исследование абсолютного и относительного содержания следующих минорных субпопуляций лейкоцитов: CD1c⁺ и CD141⁺ миелоидных дендритных клеток, CD14⁺/CD16⁺ моноцитов крови, моноцитарных и гранулоцитарных (CD15⁺ и CD33⁺) миелоидных супрессорных клеток у 33 пациентов с инфекционным мононуклеозом (ИМ) в сравнении со здоровыми добровольцами. У пациентов с ИМ выявлено статистически значимое перераспределение субпопуляций миелоидных дендритных клеток с увеличением содержания CD141⁺ клеток, что указывает на их роль в иммунопатогенезе болезни. Установлено снижение абсолютного содержания плазматочных дендритных клеток, что свидетельствует о их миграции в лимфоидные ткани или о селективной гибели. Содержание CD15⁺ миелоидных супрессорных клеток было увеличено, что ослабляет возможности противовирусного иммунитета и в то же время, вероятно, предотвращает чрезмерную пролиферацию Т-клеток. Выявленное снижение содержания миелоидных супрессорных клеток моноцитарного происхождения свидетельствует о ВЭБ-индуцированной гиперактивации иммунитета. Таким образом, показано, что у пациентов с ИМ имеются разноплановые изменения в содержании минорных субпопуляций лейкоцитов, что указывает на выраженный дисбаланс между про- и противовоспалительными факторами иммунитета.

Ключевые слова: инфекционный мононуклеоз, дендритные клетки, миелоидные супрессорные клетки, моноциты.

A. Y. HANCHAROU, G. M. DAVIDOVICH, I. A. KARPAU, A. V. DUZH, I. U. RAMANAVA, L. P. TITOV

PERIPHERAL BLOOD DENDRITIC CELLS, MONOCYTES, MYELOID-DERIVED SUPPRESSOR CELLS IN PATIENTS WITH ACUTE EBV-INFECTION

In the current investigation the relative and absolute count of minor leukocyte subsets was assayed: CD1c⁺ and CD141⁺ myeloid dendritic cells, CD14⁺/CD16⁺ blood monocytes, monocytic and granulocytic (CD15⁺ and CD33⁺) myeloid-derived suppressor cells in 33 patients with infectious mononucleosis compared with healthy controls. In patients with infectious mononucleosis the statistically significant myeloid dendritic cell subset redistribution was determined with the increase of CD141⁺ cells, indicative of its role in the immunopathogenesis of the disease. The decrease of the plasmacytoid dendritic cell count in patients with mononucleosis was observed, suggesting the migration to the lymphoid tissue or the selective depletion. The CD15⁺ myeloid suppressor cells count was increased, which decreased the antiviral immunity and at the same time, possibly prevented an excessive T-cell proliferation. The monocytic myeloid-derived suppressor cell count was reduced, explaining the EBV-induced immune system hyperstimulation. Thus it was established that patients with infectious mononucleosis exhibited diverse changes in the content of the minor leukocyte subsets, thus indicating a marked imbalance between pro- and anti-inflammatory immunity factors.

Keywords: infectious mononucleosis, dendritic cells, myeloid suppressor cells, monocytes.

Введение. В последние годы в генезе как инфекционной, так и соматической патологии все большее значение приобретают герпесвирусы. Они занимают одно из ведущих мест в связи с широким распространением, многообразием клинических проявлений и различными путями передачи [1–4]. По данным многочисленных исследований, вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) является достаточно распространенным герпесвирусом [1, 3–4]. Возраст инфицирования зависит от социально-экономических условий, урбанизации, скученности населения. В развитых странах инфицирование людей наблюдается в более раннем возрасте, а распространенность инфекции выше, чем в развивающихся странах [2]. Установлено, что клиника инфекции, вызванной ВЭБ, у взрослых

характеризуется наличием симптомов интоксикации, лимфаденопатии, гепатоспленомегалии, тонзиллита, аденоидита, у ряда пациентов – наличием интерстициальной пневмонии, увеита, гепатита, патологии ЦНС [2–4]. Клиническая значимость инфекционного мононуклеоза (ИМ) обусловлена вовлечением в патологический процесс иммунной, сердечно-сосудистой, пищеварительной, мочевыделительной, нервной и эндокринной систем. Хронизация ВЭБ может привести к неблагоприятным последствиям в виде X-связанного лимфопролиферативного синдрома, В-лимфопролиферативных заболеваний, синдрома хронической усталости, ВЭБ-ассоциированного гемофагоцитарного синдрома и ряда других заболеваний [1–6]. В Беларуси маркеры латентной ВЭБ-инфекции выявлены у 48,9 % населения [5].

ВЭБ по основным свойствам схож с другими герпес-вирусами. Известно, что ВЭБ обладает тропностью к В-лимфоцитам, репродуцируется в них, вызывает повреждение механизма апоптоза в В-лимфоцитах и активацию других иммунокомпетентных клеток, вследствие чего способен приводить к значительным нарушениям в иммунном статусе человека: изменение количества и свойств отдельных популяций лимфоцитов и гранулоцитов, нарушение функции моноцитов, дисбаланс продукции цитокинов. В результате развивается вторичная иммунная недостаточность с выраженной депрессией клеточного иммунитета. В то же время сведения о роли антигенпредставляющих клеток (АПК) в иммунопатогенезе ИМ довольно противоречивы [6–13], а исследования, посвященные оценке содержания миелоидных супрессорных клеток (МЛСК) гранулоцитарного (Г-МЛСК) или моноцитарного (М-МЛСК) происхождения при ИМ не проводились.

Цель работы – изучить в динамике содержание субпопуляций дендритных клеток, моноцитов и миелоидных супрессорных клеток у пациентов с инфекционным мононуклеозом.

Объекты и методы исследований. *Объектами* для *in vitro* исследования служили 66 образцов венозной крови 33 пациентов с ИМ (Городская клиническая инфекционная больница г. Минска). Медианный возраст пациентов составил 20,0 (19,0–25,0) года (у женщин – 19,0 (18,0–20,0) года, у мужчин – 22,5 (19,0–25,5) года). С целью уточнения диагноза исследованы маркеры ВЭБ-инфекции методом латекс-агглютинации (ЛА), ПЦР (качественная ПЦР для детекции ВЭБ в плазме крови) и выполнено определение специфических IgM к капсидному антигену ВЭБ методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих тест-систем. Терапию пациентов проводили в соответствии с утвержденными протоколами лечения. Пациентов обследовали дважды: на момент поступления в стационар (группа П1) и спустя 2–3 мес. после выписки (группа П2). Для получения референсных значений ряда показателей использовали 22 образца донорской крови. Кроме того, в расчетах в качестве референсных (контрольная группа, К) использовали ранее полученные показатели иммунного статуса 24 доноров и здоровых добровольцев (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии), сопоставимых по возрасту и полу с пациентами.

Проточная цитометрия. Имунофенотип клеток крови определяли методом проточной цитометрии. Исследуемый образец крови в количестве 100 мкл инкубировали с соответствующими моноклональными антителами на протяжении 15 мин при температуре 4 °С. Использовали следующие панели антител: 1) lin (CD3, CD19, CD20, CD16, CD56, CD14) – FITC (ExBio, Чехия); CD141 (BDCA-3) – PE, клон 1A4 (BD, США); CD45 – PerCP, клон HI40a (BioLegend, США); CD11c – PE-Cy7, клон B-ly6 (BD, США); CD16 – BV421, клон 3G8 (BD, США); HLA-DR – V500, клон G46-6 (BD, США); CD1c (BDCA-1) – APC, клон AD5-8E7 (Miltenyi Biotec, ФРГ); CD14 – APC-Cy7, клон MφP9 (BD, США); 2) CD123 – PE, клон SSDCLY107D2 (Beckman Coulter, США); HLA-DR – PE-Cy7, клон Immu-357 (Beckman Coulter, США); 3) CD11b – APC, клон MEM-174 (ExBio, Чехия), CD15 – PE, клон MEM-158 (ExBio, Чехия), CD33 – PerCP-Cy5.5, клон WM53 (ExBio, Чехия), HLA-DR – V500, клон G46-6 (BD, США). Для корректной настройки параметров компенсации для каждой группы образцов готовили single-stained контроли. Лизировали эритроциты раствором хлорида аммония на протяжении 15 мин при температуре 18–25 °С. Затем клетки осаждали путем центрифугирования в течение 5 мин, удаляли супернатант и суспендировали клетки в 300 мкл DPBS. Учет проводили на проточном цитометре FACSCanto II. В каждом образце подсчитывали не менее 2·10⁶ клеток. Данные анализировали при помощи программы FACSDiva версии 7 [14].

Статистический анализ. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программ Statistica версии 10 (StatSoft, США) [15]. Значения показателей представлены

преимущественно в виде Me (25–75), где Me – медиана, а 25 и 75 – интерквартильный размах в виде 25-й и 75-й процентилей. Для сравнения групп данных и изучения корреляционных взаимосвязей использовали непараметрические методы. Для сравнения двух независимых выборок применяли U-критерий Манна–Уитни, а для сравнения связанных выборок – тест Уилкоксона. В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. **Содержание дендритных клеток.** Дендритные клетки (ДК) крови – антигенпредставляющие клетки, обеспечивающие инициацию и направленность адаптивного иммунного ответа. ДК человека по происхождению разделяют на две группы: миелоидные ДК (мДК), имеющие миелоидное происхождение, и плазматоидные ДК (пДК), дифференцированные из лимфоидных клеток-предшественников [16, 17]. По экспрессии ряда молекул и выполняемым ими функциям можно выделить множество субпопуляций ДК. Так, мДК крови разделяют на две крупные субпопуляции: DC1, экспрессирующие молекулу CD1c – BDCA-1, и DC2 ДК, которые экспрессируют молекулу CD141 (BDCA-3) и функционально схожи с CD8⁺ ДК мышей [16, 17]. Выполняемые ДК функции захвата антигена и его представления на мембране Т-клеток обуславливают широкий спектр поверхностных молекул, к которым относят паттерн-распознающие рецепторы, молекулы ГКС II класса, костимуляторные и коингибиторные молекулы, молекулы клеточной адгезии, хемокиновые рецепторы. Ранее выполненные исследования в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии показали важную роль ДК в иммунопатогенезе инфекционных и иммунных заболеваний [18–20].

Нами разработана следующая стратегия гейтирования ДК: вначале исключали на цитограмме FSC-Area/FSC-Height конгломераты из учета, затем визуально формировали регион CD45⁺ лейкоцитов, в котором последовательно определяли границы региона мононуклеарных клеток (рис. 1). В полученном регионе анализировали экспрессию молекулы HLA-DR и популяционных (lineage) маркеров: CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 и CD56. Учитывая, что ДК экспрессируют молекулы комплекса гистосовместимости II класса при отсутствии экспрессии маркеров других клеточных популяций, выделяли соответствующим образом регион, содержащий ДК (lin[–]HLA-DR⁺). В данном регионе анализировали экспрессию молекулы CD11c – основного маркера мДК. Подсчитывали относительное число CD11c⁺ мДК среди лейкоцитов. Далее в регионе HLA-DR⁺lin[–] учитывали число клеток, экспрессирующих молекулы CD11c и CD1c, а также CD11c⁺CD141^{hi} клеток [21, 22].

Исследования показали, что у пациентов с ИМ относительное содержание CD11c⁺ мДК снижено в 2 раза в сравнении с таковым в группе здоровых добровольцев ($p = 0,0001$), а абсолютное их число также ниже контрольных значений ($p = 0,037$) (см. таблицу). При этом относительное и абсолютное содержание CD1c⁺ субпопуляции ДК было уменьшено ($p = 0,001$ и $p = 0,01$ соответственно).

Содержание субпопуляций моноцитов, ДК и МЛСК в периферической крови пациентов с ИМ

Субпопуляция клеток	Группа			Уровень значимости (p)		
	Здоровые добровольцы (К), n = 22–24	Пациенты с ИМ до терапии (П1), n = 33	Пациенты с ИМ после терапии (П2), n = 33	П1 vs К ^A	П1 vs К ^B	П1 vs П2 ^C
«Классические» моноциты: % от числа моноцитов ×10 ⁶ /мл	86,3 (82,4–88,4) 0,368 (0,298–0,429)	88,0 (84,5–93,0) 0,496 (0,286–0,61)	85,4 (83,2–91,0) 0,352 (0,247–0,484)	0,1 0,295	0,743 0,864	0,36 0,17
«Промежуточные» моноциты: % от числа моноцитов ×10 ⁶ /мл	3,4 (1,9–5,4) 0,016 (0,006–0,022)	5,65 (3,4–8,26) 0,024 (0,016–0,042)	5,5 (3,7–10,64) 0,025 (0,016–0,042)	0,028 0,02	0,047 0,047	0,94 0,36
«Неклассические» моноциты: % от числа моноцитов ×10 ⁶ /мл	5,1 (0,9–7,0) 0,023 (0,003–0,030)	1,78 (0,85–3,26) 0,01 (0,005–0,01)	3,04 (1,85–4,42) 0,013 (0,008–0,022)	0,022 0,034	0,463 0,628	0,07 0,1
CD11c ⁺ мДК: % от числа лейкоцитов ×10 ⁶ /мл	0,255 (0,224–0,360) 0,016 (0,012–0,021)	0,13 (0,093–0,24) 0,013 (0,006–0,02)	0,225 (0,165–0,352) 0,015 (0,009–0,02)	0,0001 0,037	0,263 0,265	0,002 0,66
CD1c ⁺ мДК: % от числа лейкоцитов ×10 ⁶ /мл	0,142 (0,106–0,156) 0,009 (0,006–0,012)	0,052 (0,028–0,09) 0,004 (0,003–0,01)	0,122 (0,081–0,167) 0,006 (0,004–0,011)	0,001 0,01	0,563 0,281	0,001 0,053

Субпопуляция клеток	Группа			Уровень значимости (p)		
	Здоровые добровольцы (К), n = 22-24	Пациенты с ИМ до терапии (П1), n = 33	Пациенты с ИМ после терапии (П2), n = 33	П1 vs K ^Δ	П1 vs K [*]	П1 vs П2 [*]
CD141 ⁺ мДК: % от числа лейкоцитов ×10 ⁶ /мл	0,021 (0,018–0,026) 0,001 (0,001–0,002)	0,017 (0,007–0,02) 0,001 (0,0004–0,002)	0,014 (0,009–0,037) 0,001 (0,0005–0,002)	0,162 0,879	0,267 0,325	0,25 0,91
пДК: % от числа лейкоцитов ×10 ⁶ /мл	0,400 (0,250–0,520) 0,022 (0,013–0,032)	0,056 (0,02–0,1) 0,004 (0,002–0,01)	0,195 (0,14–0,34) 0,01 (0,008–0,02)	1,3·10 ⁻¹⁰ 3·10 ⁻⁹	0,0002 0,0002	3·10 ⁻⁶ 0,00003
CD15 ⁺ МЛСК: % от числа лейкоцитов ×10 ⁶ /мл	0,022 (0,007–0,048) 0,001 (0,001–0,004)	0,042 (0,019–0,079) 0,003 (0,001–0,005)	0,165 (0,112–0,320) 0,011 (0,006–0,016)	0,03 0,04	0,0004 0,001	0,00008 0,003
CD33 ⁺ МЛСК: % от числа лейкоцитов ×10 ⁶ /мл	0,051 (0,017–0,081) 0,003 (0,001–0,006)	0,046 (0,022–0,085) 0,004 (0,001–0,006)	0,056 (0,026–0,146) 0,004 (0,001–0,009)	0,90 0,71	0,39 0,57	0,48 0,94
M-МЛСК: % от числа лейкоцитов ×10 ⁶ /мл	0,32 (0,23–0,37) 0,018 (0,016–0,026)	0,09 (0,05–0,17) 0,007 (0,005–0,015)	0,23 (0,15–0,45) 0,013 (0,008–0,026)	0,004 0,007	0,472 0,325	0,02 0,12

Примечание. * – тест Вилкоксона; Δ – тест Манна-Уитни.

В то же время содержание CD141⁺ мДК у пациентов с ИМ в сравнении со здоровыми добровольцами достоверно не отличалось ($p > 0,05$). В результате соотношение CD1c⁺ мДК/CD141⁺ мДК составило 3,9 (1,9–7,6) у пациентов с ИМ и 6,2 (5,6–7,3) в группе здоровых добровольцев ($p = 0,02$). Принимая во внимание результаты расчета данного соотношения, можно сделать вывод о том, что у пациентов с ИМ имеет место перераспределение BDCA-1 и BDCA-3 субпопуляций в сторону клеток с фенотипом BDCA-3. Данное наблюдение, по всей видимости, подтверждает ранее установленный факт вовлеченности CD141⁺ субпопуляции ДК в презентацию вирусных антигенов после поглощения фрагментов мертвых клеток, содержащих вирусные частицы, и указывает на участие BDCA-3⁺ мДК в иммунном ответе против ВЭБ [23].

Абсолютное и относительное содержание lin⁻CD123⁺HLA-DR⁺ пДК у пациентов с ИМ было ниже (в 5 и 7 раз соответственно) по сравнению с аналогичными показателями в группе здоровых добровольцев, что, очевидно, указывает на вовлеченность пДК в иммунопатогенез ИМ. Поскольку пДК являются основной интерферон(ИНФ)-α-продуцирующей популяцией клеток крови, уменьшение их числа может являться одной из причин неадекватного иммунного ответа на вирус и, как следствие, хронизации или затяжного течения заболевания. Наше исследование, таким образом, объясняет факт значительного снижения содержания ИНФ-α у пациентов с ИМ, показанное в ряде исследований [24].

Несмотря на то что содержание всех субпопуляций мДК в период реконвалесценции (3 мес.) пришло в норму почти у всех пациентов, содержание пДК хотя и было выше, чем у пациентов в острый период, все равно не достигало показателей здоровых добровольцев (у здоровых добровольцев – 0,400 (0,250–0,520) %, у пациентов в острый период – 0,056 (0,02–0,1), у пациентов в период реконвалесценции – 0,195 (0,14–0,34) %).

Моноциты. Известно, что моноциты крови не являются однородной популяцией клеток. Так, по степени экспрессии молекул CD14 и CD16 охарактеризованы три основные субпопуляции: CD14⁺⁺CD16⁻ – «классические» моноциты, CD14⁺⁺CD16⁺ – «промежуточные» моноциты и CD14⁺CD16⁺⁺ – «неклассические» моноциты [25, 26]. «Классические» моноциты характеризуются высокой фагоцитарной активностью, высокой экспрессией рецепторов лектинового типа, выполняют антиапоптотическую функцию. «Неклассические» моноциты, в отличие от «классических», выполняют проапоптотическую и регуляторную функции. «Промежуточные» моноциты отличаются высокой продукцией ROS, способностью стимулировать пролиферацию Т-клеток, ангиогенез (Tie-2⁺). В процессе жизненного цикла «классические» моноциты, по всей видимости, дифференцируются в «промежуточные» и «неклассические». В настоящее время активно дискутируется роль «промежуточных» и «неклассических» моноцитов при различных патологических состояниях [25, 26].

Анализ моноцитов включал последовательное гейтирование лейкоцитов, мононуклеаров, а затем моноцитов, с помощью которого анализировалась интенсивность экспрессии молекул CD14 и CD16 (рис. 1). Проведен расчет процентного содержания данных субпопуляций от числа всех CD14⁺ моноцитов крови (см. таблицу) [27].

У пациентов с ИМ выявлено статистически достоверное увеличение содержания промежуточных форм моноцитов (абсолютные и относительные значения). В то же время относительное содержание числа «неклассических» моноцитов было достоверно снижено.

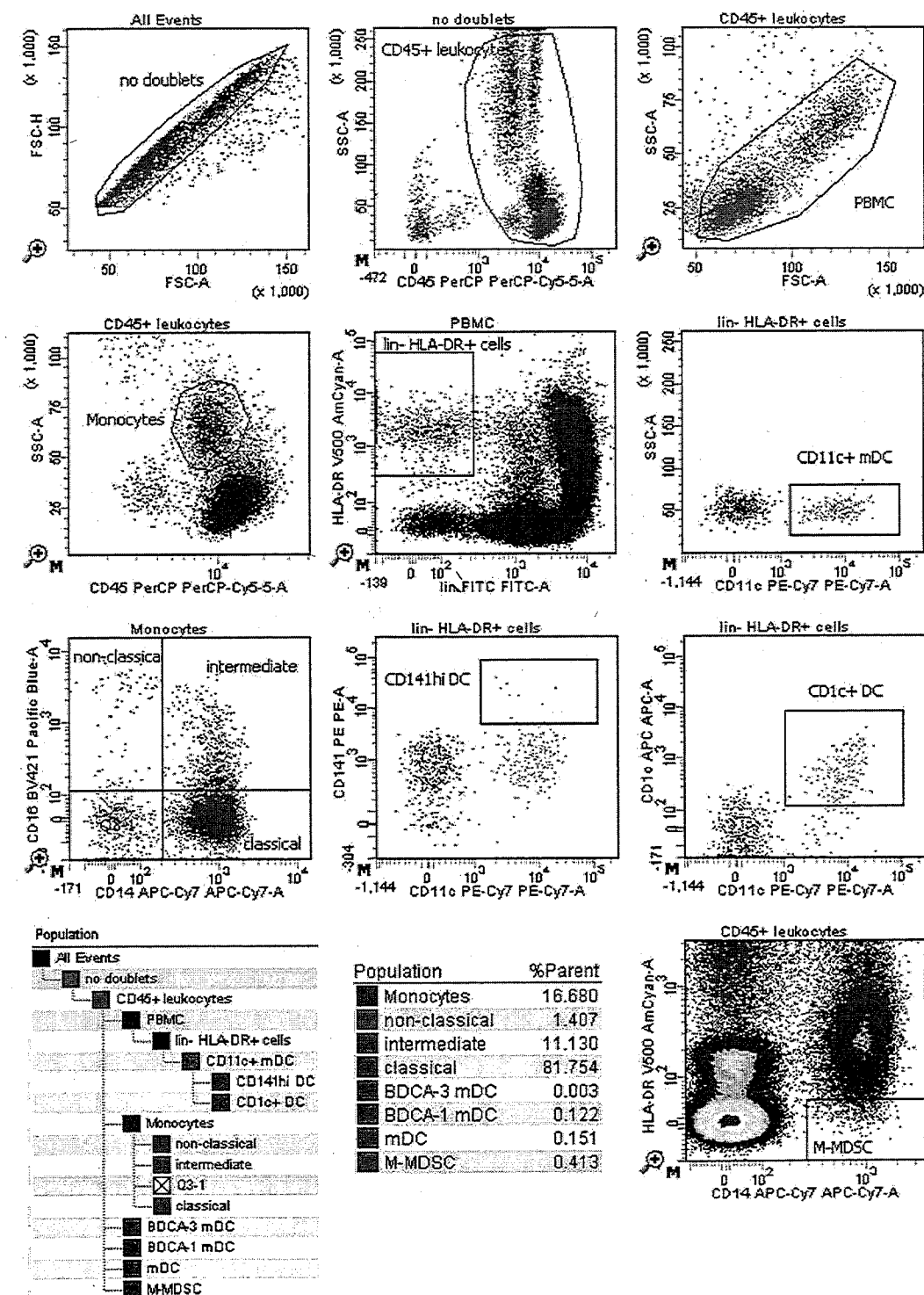


Рис. 1. Гейтирование мДК и моноцитов

Известно, что промежуточные формы моноцитов характеризуются высокой продукцией свободных радикалов кислорода, способностью к активной стимуляции пролиферации Т-клеток. «Неклассические» же моноциты выполняют преимущественно регуляторную функцию, в том числе инициируя апоптоз иммунокомпетентных клеток. Увеличение числа промежуточных и снижение содержания неклассических форм моноцитов у пациентов с ИМ указывает на нарушенный баланс между субпопуляциями, способствующий усилению пролиферации Т-клеток. Следует отметить, что среднegrupповое содержание промежуточных форм моноцитов сохранялось и в период реконвалесценции.

Содержание МЛСК. МЛСК представляют собой крайне гетерогенную популяцию активированных незрелых клеток миелоидного происхождения, которая обладает способностью подавлять эффекторный иммунный ответ. Известно, что МЛСК человека имеют моноцитарное либо гранулоцитарное происхождение. Г-МЛСК являются незрелыми миелоидными клетками, не несущими популяционных маркеров зрелых гранулоцитов и молекул II класса ГКС, но экспрессирующими молекулы CD11b, CD33 и/или CD15 [28, 29]. М-МЛСК характеризуются отсутствием либо значительным снижением экспрессии молекулы HLA-DR (CD14⁺HLA-DR^{lo/neg}), т. е. представляют собой моноциты, по каким-то причинам утратившие молекулы ГКС.

В то же время ряд авторов под МЛСК человека понимают CD33⁺HLA-DR⁻ клетки, под Г-МЛСК – CD66b⁺/CD33^{int}/HLA-DR⁻, CD11b⁺VEGFR1⁺CD66b⁺, CD62L^{lo/neg}CD16^{lo/neg}, CD33⁺HLADR^{low} NIF1α⁺/STAT3⁺ или CD11b⁺HLA-DR^{low}/EBPβ⁺ клетки, а под М-МЛСК – CD33⁺/CD14⁺/HLA-DR^{low}, причем этот список можно было бы существенно пополнить. Тем не менее, ни один из предложенных вариантов до сих пор не получил широкого распространения, и, несмотря на многочисленные исследования, популяция МЛСК продолжает оставаться относительно слабо охарактеризованной.

МЛСК весьма эффективно подавляют иммунный ответ, уменьшая число антиген-специфических Т-клеток. К настоящему времени накоплена информация о роли МЛСК в иммунопатогенезе онкозаболеваний. Показано значительное увеличение доли МЛСК у пациентов со злокачественными новообразованиями разной локализации, преимущественно на поздних стадиях болезни. Учитывая выявленную способность МЛСК подавлять пролиферацию и вызывать анергию Т-клеток, в том числе CD8⁺ лимфоцитов, стимулировать формирование Т-регуляторных клеток, ингибировать функциональную активность АПК, было высказано предположение, что МЛСК играют важную роль в хронизации вирусных инфекций. Так, в ряде работ дискутируется роль Г-МЛСК в патогенезе хронического гепатита С.

Использованная нами стратегия гейтирования Г-МЛСК включала следующие последовательные действия: 1) на точечной цитограмме, построенной в координатах FSC-Area и FSC-Height, выделяли регион, не содержащий клеточные конгломераты; 2) в полученном регионе на цитограмме светорассеяния отграничивали регион нейтрофилов; 3) выделяли регион клеток, не экспрессирующих HLA-DR и популяционные маркеры; 4) клетки из данного региона проецировали на цитограммы в координатах CD11b/CD15 и CD11b/CD33. Г-МЛСК определяли как клетки, коэкспрессирующие два маркера: CD11b⁺CD15⁺ и CD11b⁺CD33⁺ (рис. 2).

Результаты исследований показывают, что у пациентов с ИМ в периферической крови имеется значительное количество МЛСК гранулоцитарного происхождения (см. таблицу).

Известно, что у всех пациентов, страдающих ИМ, выявляют относительную или абсолютную гранулоцитопению. Несмотря на это, показано, что у пациентов с ИМ как в острый период, так и в период реконвалесценции статистически достоверно увеличено абсолютное и относительное содержание CD15⁺ Г-МЛСК ($p < 0,03$). Причем у реконвалесцентов относительное содержание Г-МЛСК достоверно выше, чем у пациентов в период разгара болезни ($p < 0,003$).

Поскольку МЛСК оказывают иммуносупрессивное действие, увеличение их содержания в крови, с одной стороны, ослабляет противовирусный иммунитет, с другой – вероятно, предотвращает чрезмерную пролиферацию Т-клеток.

Исследование содержания CD33⁺ Г-МЛСК показало отсутствие достоверных различий между пациентами на разных стадиях заболевания и здоровыми добровольцами, а также между пациентами в периодах разгара заболевания и реконвалесценции.

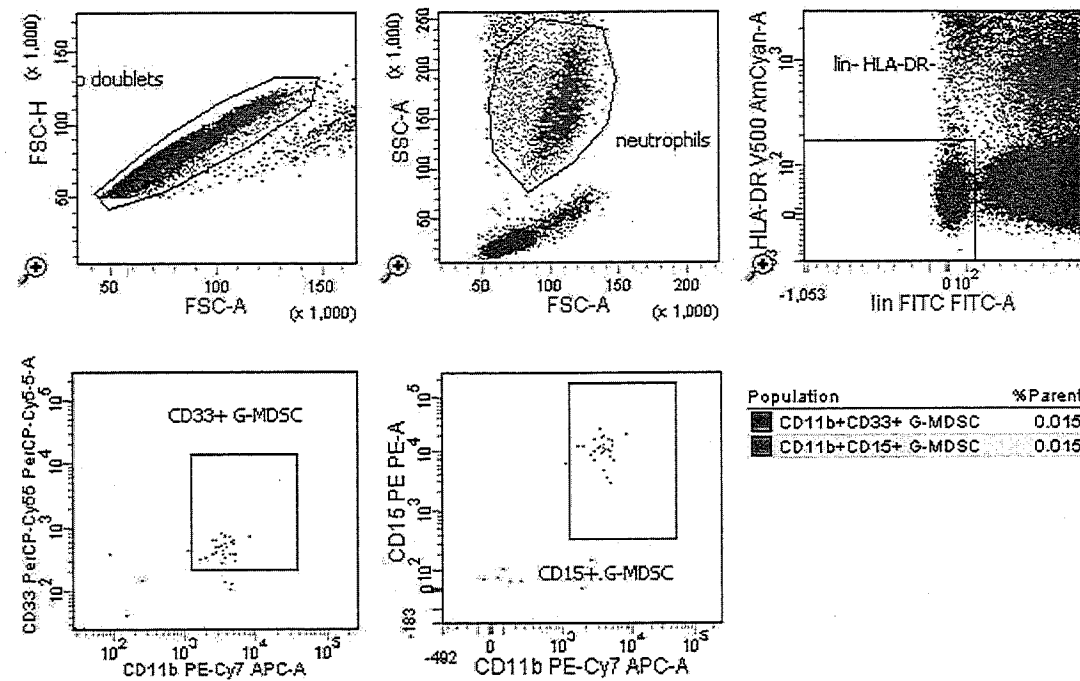


Рис. 2. Гейтирование Г-МЛСК

Отметим, что количественные показатели Г-МЛСК, полученные в настоящем исследовании, значительно ниже, чем приведенные в некоторых работах. Ответ на данный вопрос заключается, как мы считаем, в стратегии гейтирования. Как показывает опыт, в процессе анализа Г-МЛСК следует выделять только регион гранулоцитов. В ряде работ авторы выполняли поиск Г-МЛСК среди всех лейкоцитов, включая мононуклеарные клетки [28, 29]. На наш взгляд, такой подход к гейтированию не корректен, так как не позволяет исключить из подсчета базофилы – клетки с небольшими размерами и гранулярностью (FSC^{lo}, SSC^{lo}), не экспрессирующие HLA-DR и популяционные маркеры CD3, CD14, CD19, слабо экспрессирующие молекулу CD16 и характеризующиеся высокой экспрессией миелоидных маркеров – CD11b, CD15 и особенно CD33. Таким образом, содержание Г-МЛСК в некоторых исследованиях завышено за счет включения базофилов.

Следует отметить, что существенная вариабельность данных затрудняет статистическую обработку. Так, например, число CD15⁺ Г-МЛСК колебалось от 0,01 до 0,596 % в группе пациентов с ИМ и от 0,004 до 0,167 % в контроле. Что касается количества CD33⁺ Г-МЛСК, то минимальное их содержание у пациентов, страдающих ИМ, составило 0,02 %, а максимальное – 0,238 %; в группе сравнения минимальное значение – 0,012 %, максимальное – 0,192 %, т. е. значения показателя отличаются в 12–16 раз.

Нами также установлено снижение в 3 раза содержания М-МЛСК у пациентов с ИМ по сравнению с контрольной группой ($p < 0,004$), что указывает на ВЭБ-индуцированную гиперстимуляцию клеток иммунной системы и существенное усиление экспрессии молекулы HLA-DR как на АПК, так и на Т-клетках (см. таблицу).

К периоду реконвалесценции медианные значения абсолютного содержания М-МЛСК у пациентов с ИМ не отличались достоверно от таковых у здоровых добровольцев ($p = 0,12$), а относительного были несколько ниже контрольных значений ($p = 0,02$). Таким образом, наряду с определением HLA-DR⁺ Т-лимфоцитов содержание М-МЛСК может являться одним из важных критериев для определения активации иммунной системы.

Заключение. Выполнено иммунологическое и клинико-лабораторное обследование в динамике 33 взрослых пациентов с острой ВЭБ-инфекцией (ИМ), которые находились на стационарном лечении в УЗ «Городская клиническая инфекционная больница» (г. Минск).

У пациентов с ИМ выявлен комплекс разноплановых изменений в содержании минорных субпопуляций лейкоцитов, что указывает на выраженный дисбаланс между про- и противовоспалительными факторами иммунитета.

Установлено уменьшение числа мДК с фенотипом CD11c⁺ и CD1c⁺, что предполагает снижение антигенпредставляющих возможностей иммунитета. Показано 7-кратное уменьшение содержания пДК – основных продуцентов интерферона-α в периферической крови, что может являться одной из причин неадекватного иммунного ответа на вирус и, как следствие, хронизации или затяжного течения заболевания.

В периферической крови пациентов с ИМ выявлено значительное количество CD15⁺ МЛСК гранулоцитарного происхождения, что, с одной стороны, ослабляет противовирусный иммунитет, с другой – вероятно, предотвращает чрезмерную пролиферацию Т-клеток. Также установлено снижение содержания моноцитарных МЛСК, что свидетельствует о гиперактивации иммунитета ВЭБ.

Таким образом, результаты исследования указывают на существенные изменения в содержании субпопуляций МЛСК, моноцитов и ДК у пациентов с ИМ и требуют дальнейших исследований для установления роли этих субпопуляций в этиопатогенезе болезни и возможности использования количественных показателей в клинической практике.

Список использованной литературы

1. Reliability of the Siemens Enzygnost and Novagnost Epstein-Barr Virus assays for routine laboratory diagnosis: agreement with clinical diagnosis and comparison with the Merifluor Epstein-Barr Virus immunofluorescence assay [Электронный ресурс] / C. Kreuzer [et al.] // BMC Infect. Dis. – 2013. – Vol. 13, N 260. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3679805>. – Дата доступа: 24.01.2016.
2. Epstein-Barr virus: the impact of scientific advances on clinical practice / H. Williams [et al.] // Blood. – 2006. – Vol. 107, N 3. – P. 862–869.
3. Luzuriaga, K. Infectious Mononucleosis / K. Luzuriaga, J. L. Sullivan // N. Engl. J. Med. – 2010. – Vol. 362, N 21. – P. 1993–2000.
4. Drăghici, S. Clinical and paraclinical aspects of infectious mononucleosis [Электронный ресурс] / S. Drăghici, A. Csep // BMC Infect. Dis. – 2013. – Vol. 13, suppl. 1. – Режим доступа: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/13/S1/P65>. – Дата доступа: 24.01.2016.
5. Серологические и эпидемиологические особенности инфекции, вызванной вирусом Эпштейна-Барр, в Республике Беларусь / Л. П. Титов [и др.] // Вопр. вирусологии. – 1999. – Т. 44, № 1. – С. 21–24.
6. Cellular immune controls over Epstein-Barr virus infection: new lessons from the clinic and the laboratory / A. B. Rickinson [et al.] // Trends Immunol. – 2014. – Vol. 35, N 4. – P. 159–169.
7. Epstein-Barr virus candidate genes and multiple sclerosis / K. C. Simon [et al.] // Multiple Sclerosis and Related Disorders. – 2015. – Vol. 4, N 1. – P. 60–64.
8. Infectious mononucleosis accompanied by clonal proliferation of EBV-infected cells and infection of CD8-positive cells / A. Arai [et al.] // Int. J. Hematol. – 2014. – Vol. 99, N 5. – P. 671–675.
9. Münz, C. Role of human natural killer cells during Epstein-Barr virus infection / C. Münz // Crit. Rev. Immunol. – 2014. – Vol. 34, N 6. – P. 501–507.
10. Taylor, G. S. The Immunology of Epstein-Barr Virus-Induced Disease / G. S. Taylor // Ann. Rev. Immunol. – 2015. – Vol. 33. – P. 787–821.
11. Katz, B. Z. Chronic fatigue syndrome following infections in adolescents / B. Z. Katz // Curr. Opin. Pediatr. – 2013. – Vol. 25, N 1. – P. 95–102.
12. Lerner, M. Abortive lytic Epstein-Barr virus replication in tonsil-B lymphocytes in infectious mononucleosis and a subset of the chronic fatigue syndrome / M. Lerner // J. Vir. Adapt. Treatm. – 2012. – Vol. 4. – P. 85–91.
13. Broderick, G. Cytokine expression profiles of immune imbalance in post-mononucleosis chronic fatigue / G. Broderick // J. Transl. Med. – 2012. – Vol. 10. – P. 191.
14. BD FACSDiva™ Software [Электронный ресурс]. – 2016. – Режим доступа: <http://www.bdbiosciences.com/us/instruments/research/software/flow-cytometry-acquisition/bd-facsdiva-software/m/111112>. – Дата доступа: 24.01.2016.
15. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica / О. Ю. Реброва. – М., 2008. – 312 с.
16. Origin and development of dendritic cells / K. Liu [et al.] // Immunol. Rev. – 2010. – Vol. 234. – P. 45–54.
17. Human dendritic cell deficiency: the missing ID? / M. Collin [et al.] // Nat. Rev. Immunol. – 2011. – Vol. 11. – P. 575–583.
18. Иммунофенотипическая характеристика миелоидных и плазматцитоидных дендритных клеток пациентов с рассеянным склерозом / А. Е. Гончаров [и др.] // Докл. НАН Беларуси. – 2010. – Т. 54, № 6. – С. 82–88.
19. Иммунофенотип плазматцитоидных дендритных клеток пациентов с системной красной волчанкой / А. Е. Гончаров [и др.] // Вес. НАН Беларуси. Сер. мед. наук. – 2010. – № 4. – С. 14–19.
20. Состояние системы мононуклеарных фагоцитов (моноцитов, дендритных клеток) у пациентов с разными формами лекарственно-устойчивого туберкулеза легких / А. Е. Гончаров [и др.] // Вес. НАН Беларуси. Сер. мед. наук. – 2012. – № 4. – С. 4–15.

21. Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans / P. Autissier [et al.] // Cytometry. Part A. – 2010. – Vol. 77A. – P. 410–419.

22. An 11-color flow cytometric assay for identifying, phenotyping, and assessing endocytic ability of peripheral blood dendritic cell subsets in a single platform / J. E. Wang [et al.] // J. Immunol. Meth. – 2009. – Vol. 341, N 1–2. – P. 106–116.

23. Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens / S. L. Jongbloed [et al.] // J. Exp. Med. – 2010. – Vol. 207, N 6. – P. 1247–1260.

24. Behavioral, virologic, and immunologic factors associated with acquisition and severity of primary Epstein-Barr virus infection in university students / H. H. Balfour [et al.] // J. Infect. Dis. – 2013. – Vol. 207. – P. 80–88.

25. Auffray, C. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells / C. Auffray // Annu. Rev. Immunol. – 2009. – Vol. 27. – P. 669–692.

26. Gordon, S. Monocyte and macrophage heterogeneity / S. Gordon, P. R. Taylor // Nat. Rev. Immunol. – 2005. – Vol. 5, N 12. – P. 953–964.

27. Мононуклеарные фагоциты, регуляторные Т-лимфоциты, циркулирующие стволовые и эндотелиальные клетки у пациентов с атеросклеротической аневризмой аорты / Л. П. Титов [и др.] // Здоровоохранение. – 2016. – № 1. – С. 4–10.

28. Khaled, Y. S. Increased levels of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in peripheral blood and tumour tissue of pancreatic cancer patients [Электронный ресурс] / Y. S. Khaled, B. J. Ammori, E. Elkord // J. Immunol. Res. – 2014. – Vol. 2014. – Режим доступа: <http://downloads.hindawi.com/journals/jir/2014/879897.pdf>. – Дата доступа: 24.01.2016.

29. Comparative analysis of monocytic and granulocytic myeloid-derived suppressor cell subsets in patients with gastrointestinal malignancies / A. Duffy [et al.] // Cancer Immunol. Immunother. – 2013. – Vol. 62. – P. 299–307.

Поступила в редакцию 03.02.2016