

УДК 618.146-006.6-097-055.2

СОСТОЯНИЕ КЛЕТОЧНОГО И ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА У ДЕВОЧЕК ПОСЛЕ ВАКЦИНАЦИИ ПРОТИВ ВПЧ

Н.В. Вознесенская, Л.И. Трубникова, Т.Ю. Корнилова, М.Л. Албутова

Ульяновский государственный университет

Настоящее исследование посвящено изучению состояния клеточного и гуморального иммунитета после вакцинации против ВПЧ у девочек. Методом иммуноферментного анализа у обследованного контингента через 6 мес. после последней прививки определяли IgG, IgM, CD4, CD8, иммунорегуляторный индекс, фагоцитоз. Установлено, что наличие у девочек герпес-вирусной инфекции снижает активность формирования поствакцинального иммунитета.

Ключевые слова: герпес-вирусная инфекция, цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барр, папиллома-вирусная инфекция, вакцины, гуморальный иммунитет, клеточный иммунитет, поствакцинальный иммунитет.

Введение. Этиологическим фактором развития рака шейки матки (РШМ) является вирус папилломы человека (ВПЧ), что было подтверждено как эпидемиологическими, так и молекулярно-биологическими исследованиями [2]. Папиллома-вирусная инфекция (ПВИ) гениталий относится к инфекциям, передающимся половым путем (ИППП) и по распространенности занимает среди них первое место. Пик распространения ПВИ у женщин наблюдается в возрасте от 18 до 24 лет, частота выявления ПВИ у женщин моложе 24 лет в 2 раза выше, чем у женщин старше 35 лет. По данным исследований последних лет, до 82 % женщин считаются инфицированными ВПЧ уже через 2 года после сексуального дебюта, даже при одном половом партнере заражено 20 % женщин [8]. Особенностью ПВИ является то, что вирус не индуцирует активный иммунный ответ. Приблизительно половина женщин, инфицированных ВПЧ, вырабатывают определяемые сывороточные антитела, но эти антитела не обязательно защищают от последующего инфицирования тем же типом ВПЧ [6, 7]. Лечение ВПЧ-инфекции, используемое в настоящее время, не является этиологическим, так как применяемые подходы лишены противовирусной специфичности и заключаются в

проведении иммунотерапии и локальном воздействии на очаг поражения. Единственным и рациональным методом предупреждения репликации ВПЧ и развития РШМ является первичная профилактика с использованием профилактической вакцины. В медицинской практике применяются две вакцины. Одна из них – квадριвалентная вакцина «Гардасил» («MSD – Мерк Шарп и Доум») – зарегистрирована более чем в 109 странах мира с 2000 г. В ноябре 2006 г. она зарегистрирована и разрешена к применению в Российской Федерации. В России и странах Евросоюза зарегистрирована также бивалентная вакцина «Церварикс». Обе вакцины изготовлены из очищенных структурных белков L1, которые самостоятельно формируют типоспецифичные для ВПЧ вирусоподобные частицы (VLPs). Эти вакцины не являются инфекционными, так как не содержат живых биологических продуктов или вирусных ДНК. Дополнительно к антигену в вакцину обычно вводятся специальные вещества – адъюванты (например, соли алюминия, используемые во многих современных вакцинах), которые адсорбируют на себе антигены и длительное время сохраняются в организме, что увеличивает их иммуногенность. Точно не установлено, каким образом вакци-

ны индуцируют защиту от вируса, однако на современном этапе считается, что она осуществляется путем включения клеточного иммунитета и иммуноглобулинов класса G. [4, 5]. Как все профилактические вакцины, ВПЧ-вакцина максимально проявляет свою эффективность, если вводится до встречи с вирусом, поэтому приоритетной популяцией для рутинной вакцинации однозначно признаны девочки-подростки до сексуального дебюта. В соответствии с рекомендациями ВОЗ, Европейского центра по профилактике и контролю над заболеваемостью и Экспертного совета по иммунизации США, плановая вакцинация 11–13-летних девочек включена в национальные программы иммунизации многих стран мира и проводится в отдельных регионах РФ. Дополнительной популяцией для рутинной вакцинации, по мнению экспертов, являются молодые женщины до 26 лет [1, 3, 7].

В Ульяновской области до настоящего времени вакцинация проводилась лишь в некоторых коммерческих медицинских центрах по желанию женщины. В 2011 г. мэрией г. Ульяновска принята Программа профилактики рака шейки матки у женщин репродуктивного возраста, рассчитанная на 5 лет. Согласно программе обследованию и вакцинации подлежали 500 девочек в возрасте 11–12 лет. Первым этапом программы явилось комплексное обследование девочек перед вакцинацией с целью оценки состояния их здоровья. В течение 2011 г. вакцинации были подвергнуты 100 девочек, половине из них была введена вакцина «Гардасил», второй половине – «Церварикс». Вакцинация осуществлялась по прилагаемым протоколам. Через 6 мес. после последней прививки проведено исследование состояния иммунной системы для выяснения особенностей формирования поствакцинального иммунитета.

Цель исследования. Изучение особенностей формирования гуморального и клеточного иммунитета у девочек после вакцинации против ВПЧ.

Материалы и методы. В течение 2011 г. 50 девочек были привиты вакциной «Церварикс» и 50 девочек – вакциной «Гардасил» согласно рекомендуемым протоколам. Через

6 мес. после последней прививки у 47 девочек проведено исследование системы гуморального и клеточного иммунитета. У обследованного контингента методом ИФА определяли абсолютное число лимфоцитов, CD4, CD8, иммунорегуляторный индекс (Тх/Тс), фагоцитоз, иммуноглобулины IgG, IgA, IgM. Все обследованные были разделены на две группы: в первую вошли 23 девочки с выявленным до вакцинации лимфоцитозом (1 группа сравнения), во вторую – 24 с нормальными показателями крови (2 контрольная группа). Статистический анализ данных проводился на персональном компьютере с использованием пакета программ Statistica 8,0. Использовались непараметрические методы статистического анализа. При сравнении показателей различных групп применяли критерии Колмогорова–Смирнова и Манна–Уитни; для сравнения зависимых показателей – критерий Вилкоксона для парных сравнений.

Результаты и обсуждение. Предыдущие исследования показали, что средний возраст начала половой жизни в Ульяновской области – 14,5 лет. Все девочки, вошедшие в настоящее исследование, были сексуально активными, 65,8 % из них находились в препубертатном периоде, т.е. относились к возрастной группе 10–12 лет. Почти половина девочек находились в состоянии ювенильной аменореи (средний возраст – $11,7 \pm 1,1$ года, что соответствует среднестатистической норме). Среди перенесенных заболеваний лидировали острые респираторные заболевания (88 %), ветряная оспа (48 %), краснуха (8 %). С одинаковой частотой установлены в анамнезе бронхиты (4 %), вегетососудистая дистония (4 %), хронический гастродуоденит (4 %) и миопия (4 %) (рис. 1).

Время менархе пришлось на возраст $12,4 \pm 1,4$ года, начало адренархе – на $11,6 \pm 1,1$ года, телархе – $11,5 \pm 1,2$ года, что свидетельствует о нормальном половом развитии обследованных девочек. Только у 9,6 % обследованных была выявлена задержка полового развития по данным УЗИ и гинекологического осмотра. В 4 случаях регистрировался повышенный индекс массы тела.

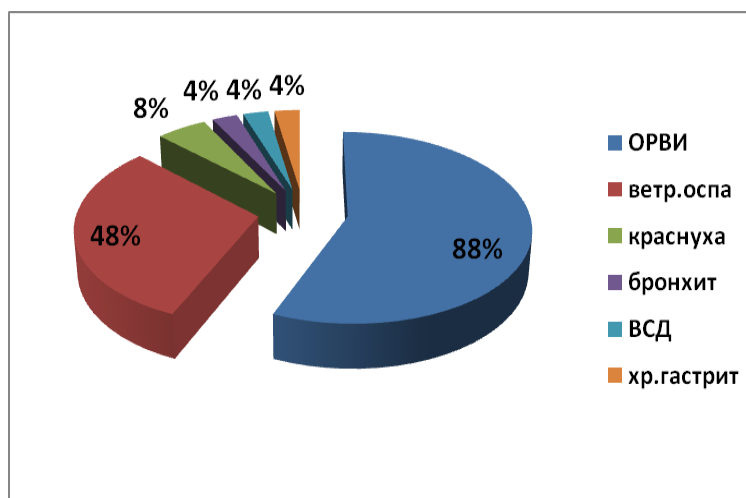


Рис. 1. Структура перенесенных заболеваний у обследованных девочек

В результате обследования установлено, что 93,6 % девочек ранее перенесли цитомегаловирусную инфекцию (ЦМВ), о чем свидетельствовало наличие IgG в сыворотке крови. Антитела к вирусу Эпштейна–Барр (ВЭБ) выявлены у 96 % девочек. Средние показатели лейкоцитов были в пределах нормы у всех обследованных. Однако при более детальном изучении показателей лейкоформулы были выявлены различия. Так, повышение уровня лимфоцитов наблюдалось у 31,4 % обследованных. Объяснить это явление можно наличием у девочек персистирующей

ЦМВ- и ВЭБ-инфекций, так как анамнестических и объективных данных, указывающих на наличие других причин, выявлено не было. Сочетанное инфицирование ЦМВ и ВЭБ наблюдалось в 54,4 % случаев. IgG к ВЭБ в сочетании с лимфоцитозом обнаружены в 1,3 % случаев. IgG к ЦМВ в сочетании с лимфоцитозом выявлены у 9,2 % девочек. Сочетание IgG к ВЭБ, IgG к ЦМВ и лимфоцитоза наблюдалось в 11,8 % (9 случаев). Эти девочки были отнесены к группе риска по особенностям формирования поствакцинального иммунитета (табл. 1).

Таблица 1

Средние показатели лейкоформулы и иммуноглобулинов в группах обследованных

Переменная	Группа контроля	Группа сравнения	Достоверность различий
Лейкоциты, мкл ⁻¹	$5,55 \times 10^9$	$5,95 \times 10^9$	0,32
Сегменты, мкл ⁻¹	2851,34	1972,23	0,0006*
Лимфоциты, мкл ⁻¹	2191,86	3466,47	0,00001**
ЦМВ IgG (КП), г/л	9,63	12,34	0,21
ВЭБ IgG (NA), г/л	40,96	37,62	0,78

Примечание. * – различия достоверны при сравнении с контролем при $p=0,0006$; ** – различия достоверны при сравнении с контролем при $p=0,00001$.

У обследованного контингента методом ИФА определяли показатели клеточного и гуморального иммунитета: абсолютное число лимфоцитов, Т-хелперы, Т-супрессоры и иммунорегуляторный индекс, показатель фаго-

цитоза, иммуноглобулины IgG, IgA, IgM.

В результате проведенного исследования было установлено, что после вакцинации концентрация лейкоцитов увеличилась у всех девочек: $6,78 \pm 1,34$ ($M \pm \sigma$) против $5,76 \pm 1,35$ до

вакцинации, хотя показатели оставались в пределах референтных значений. В группе с лимфоцитозом число лейкоцитов увеличилось с $5,72 \pm 1,52$ до $6,62 \pm 1,26$, $p=0,000044$; в группе без лимфоцитоза – с $5,80 \pm 1,20$ до $6,96 \pm 1,44$, $p=0,16$.

Абсолютное число лимфоцитов уменьшилось с $2,83 \pm 0,86$ до $2,62 \pm 0,73$, $p=0,16$. В 1 группе выявлено достоверное уменьшение абсолютных показателей лимфоцитов: с $3,35 \pm 0,88$ до $2,63 \pm 0,51$. В группе без лимфоцитоза такого различия нет: до вакцинации – $2,34 \pm 0,45$, после вакцинации – $2,62 \pm 0,90$.

При наличии моноинфекции лимфоциты с 3,07 (медиана 2,69 (2,36–3,85)) снизились до уровня 2,54 (медиана 2,44 (2,23–2,87)) после вакцинации. При сочетанной инфекции показатели до и после вакцинации достоверно не отличались: 2,77 (медиана 2,53 (2,20–3,24)) и 2,66 (медиана 2,50 (2,05–3,03)) соответственно. Процентное содержание лимфоцитов также достоверно уменьшилось: до вакцинации – $48,32 \pm 10,45$ %, после – $37,38 \pm 0,76$ %, $p=0,000003$. Аналогичная динамика просле-

живается по всем группам. 1 группа: до вакцинации – $57,52 \pm 5,12$ %, после вакцинации – $39,09 \pm 9,80$ %, $p=0,000046$; 2 группа: до – $39,50 \pm 5,23$ %, после – $35,75 \pm 7,47$ %, $p=0,039250$. Наличие моно- или сочетанной вирусной инфекции не изменяло общую тенденцию, которая также проявлялась снижением процентного показателя лимфоцитов после вакцинации. Это снижение было статистически выраженным. На фоне снижения лимфоцитов процент сегментоядерных лейкоцитов увеличился с $43,15 \pm 11,02$ до $54,09 \pm 8,82$, $p=0,000017$. При этом более выраженное увеличение было отмечено у девочек 1 группы: с $33,57 \pm 5,62$ до $52,70 \pm 10,22$ %, $p=0,000077$. Наличие сочетанной инфекции у обследованных также приводило к значимому увеличению сегментов ($p=0,000895$).

Оценивая показатели гуморального иммунитета, следует заметить, что концентрация IgM в группе с исходным лимфоцитозом оказалась достоверно выше и составила $0,82 \pm 0,16$ г/л (во второй – $0,77 \pm 0,16$ г/л), $p<0,025$ (табл. 2)

Таблица 2

Показатели иммунограммы у девочек I и II групп

Показатели	Среднее значение		Стандартное отклонение		Достоверность различий, p
	1 группа, M_1	2 группа, M_2	1 группа, σ_1	2 группа, σ_2	
IgM, г/л	0,81696	0,76739	0,158184	0,155365	$p<0,025$
IgG, г/л	9,63130	9,95217	2,046619	1,067576	$p>0,10$
IgA, г/л	2,38522	2,42174	0,378860	0,559339	$p>0,10$
CD4	0,77739	0,82208	0,142421	0,069406	$p<0,025$
CD8	0,41652	0,42125	0,110438	0,063814	$p>0,10$
Тх/Тс	1,92391	1,98000	0,371407	0,252173	$p>0,10$
Фагоц., %	73,63636	73,66667	2,012945	2,288689	$p>0,10$

Примечание. Использован критерий Колмогорова–Смирнова, различия статистически значимы при $p<0,05$.

Иммунорегуляторный индекс оказался повышенным у 45 % обследованных девочек, причем несколько выше показатели были во 2 группе (за счет увеличения Т-хелперов). Показатели фагоцитоза по группам различий не имели (по 74 % и в первой и во второй

группах). Гуморальный иммунитет характеризовался более высокими показателями IgG у девочек 2 группы ($9,95 \pm 1,07$ г/л против $9,63 \pm 2,05$ г/л в первой группе), однако первичный иммунный ответ был более активным у девочек с лимфоцитозом: $0,82 \pm 0,16$ г/л про-

тив $0,77 \pm 0,16$ г/л. В этой группе наблюдалась тенденция снижения активности гуморального иммунитета на фоне сочетанной ЦМВ- и ВЭБ-инфекции (табл. 2), хотя все показатели оставались в пределах референтных значений.

Клеточный иммунитет при наличии сочетанной инфекции характеризовался снижением Т-хелперов ($0,76 \pm 0,13$ против $0,82 \pm 0,11$), что выразилось в более низких показателях иммунорегуляторного индекса.

Таким образом, исходное повышение уровня лимфоцитов у обследованного контингента, по всей видимости, было вызвано наличием у девочек персистирующей герпес-вирусной инфекции определенной давности, что согласуется с мнением некоторых авторов. Так, на ведущую роль Т-клеточного иммунного ответа в течении Эпштейн–Барр-инфекции указывает О.А. Павленко, отмечая, что в первую неделю заболевания возрастает количество Т-лимфоцитов именно за счет увеличения доли CD3+, CD8+ Т-киллеров [6]. В работе А.П. Кудина описывается роль CD4+ в элиминации ВЭБ [3]. По мнению других исследователей, в жизненном цикле ВЭБ большое значение имеют В-лимфоциты [1, 2, 10, 11]. Работы, посвященные изучению иммунного статуса детей с ЦМВИ, малочисленны и неоднозначны. Авторы, рассматривая изменения, происходящие в иммунном статусе при ЦМВ-инфицировании, как правило, выделяют два вида изменений: повышение активности отдельных звеньев иммунной системы и/или недостаточность других, т.е. иммунный дисбаланс [1]. В ряде исследований отмечена активация клеточного и гуморального звеньев иммунитета, сопровождающаяся повышением содержания естественных киллеров, Т-хелперов и/или цитотоксических лимфоцитов, гиперпродукцией сывороточных иммуноглобулинов [1].

Заключение. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что рецепторы к антигенам обеих вакцин расположены на В- и Т-лимфоцитах, что подтверждается иммунным ответом по гуморальному и клеточному типу, причем в 1 группе, где непродолжительный период инфицирования сопровождался лимфоцитозом, более активным

был иммунный ответ по гуморальному типу, а при более длительном периоде инфицирования выраженным оказался Т-клеточный ответ. Введение вакцинных антигенов способствовало восстановлению нормальных соотношений между лимфоцитами и нейтрофилами. При наличии сочетанной вирусной инфекции (ЦМВ и ВЭБ) у вакцинированных девочек наблюдается тенденция к снижению активности формирования поствакцинального иммунитета.

1. Горейко Т. В. Влияние структуры герпес-вирусного микстинфицирования на показатели иммунного ответа / Т. В. Горейко, Л. Б. Дрыгина // Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины : сб. тезисов научно-практической конференции молодых ученых 24.05.2011. – СПб. : СПбМАПО, 2011. – С. 27–29.

2. Горейко Т. В. Современные представления об иммунопатогенезе инфекции, вызванной вирусом Эпштейн–Барр / Т. В. Горейко, Н. М. Калинина, Л. Б. Дрыгина // Инфекция и иммунитет. – 2011. – Т. 1, № 2. – С. 121–130.

3. Кудин А. П. Эта «безобидная» вирус Эпштейн–Барр инфекция. Ч. 1. Характеристика возбудителя. Реакция иммунной системы на вирус / А. П. Кудин // Мед. новости. – 2006. – № 7. – С. 14–22.

4. Минкина Г. Н. Вакцинопрофилактика рака шейки матки и других заболеваний, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией / Г. Н. Минкина // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2007. – Т. 6, № 37. – С. 47–51.

5. Новик В. И. Эпидемиология рака шейки матки, факторы риска, скрининг / В. П. Новик // Практическая онкология. – 2002. – Т. 3, № 3. – С. 156–162.

6. Павленко О. А. Роль вируса Эпштейн–Барр в патологии верхних отделов пищеварительного тракта у детей / О. А. Павленко, В. А. Щербак // Дальневосточный мед. журн. – 2009. – № 3. – С. 53–55.

7. Роговская С. И. Вакцины против вируса папилломы человека: новые возможности профилактики цервикального рака / С. И. Роговская // Гинекология. – 2007. – Т. 9, № 1. – С. 15–20.

8. Сочетанная инфекция как причина развития диспластических процессов шейки матки / Н. В. Вознесенская [и др.] // Доктор Ру. – 2013. – № 1 (79). – С. 20–26.

9. Шахгильдян В. И. Клиническая характеристика, диагностика и лечение цитомегаловирусной инфекции у больных с ВИЧ-инфекцией / В. И. Шахгильдян // Медицинская кафедра. – 2003. – № 1. – С. 29–36.

10. Epstein–Barr virus quantitation by real time

PCR targeting multiple gene segments: a novel approach to screen for virus in paraffin-embedded tissue and plasma / J. L. Ryan [et al.] // *J. Mol. Diagn.* – 2004. – Vol. 6, № 4. – P. 378–385.

11. *Gulley M. L.* Laboratory assays for Epstein-Barr virus related disease / M. L. Gulley, W. Tang // *J. Mol. Diagn.* – 2008. – Vol. 10, № 4. – P. 279–292.

12. Herpesviruses as possible cofactors in HPV-16-related oncogenesis / S. Szostek [et al.] // *Acta Biochimica Polonica.* – 2009. – Vol. 56, № 2. – P. 337–342.

13. High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up / L. L. Villa [et al.] // *Br. J. Cancer.* – 2006. – Vol. 95 (11). – P. 1459–1466.

14. HPV vaccines and screening in the prevention of cervical cancer / F. X. Bosch [et al.] // *Vaccine.* – 2006. – Vol. 31 (suppl. 3). – S1–S264.

15. HPV6, 11, 16, and 18 Immunogenicity of four multi-valent HPV vaccine formulations in non-human primates / C. C. Roberts [et al.] // *HPV-2010 : 26 International Papillomavirus Conference.* July 3–8, 2010. – Vol. 1. – P. 1123–1125.

16. Induction of immune memory following administration of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus (HPV) types 6/11/16/18 L1 virus-like particle (VLP) vaccine / S. E. Olsson [et al.] // *Vaccine.* – 2007. – Vol. 25. – P. 4931–4935.

17. Prevalence of the most common high-risk HPV-genotypes among woman in three new independent states of the former Soviet Union. NIS Study Group / S. M. Kulmala [et al.] // *J. Med. Virol.* – 2007. – Vol. 79 (6). – P. 771–781.

18. Quadrivalent human papillomavirus Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) / L. E. Markowitz [et al.] // *MMWR Recomm Rep.* – 2007. – Vol. 56 (R-2) – P. 1–24.

19. Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) // *MMWR.* – 2007. – Vol. 56 (RR02). – P. 1–24.

20. *Stanley M.* Prophylactic HPV vaccines: underlying mechanisms / M. Stanley, D. R. Lowy, I. Frazer // *Vaccine.* – 2006. – Vol. 24 (suppl. 3). – S106–S113.

21. *Tino F. Schwarz.* Immune response to human papillomavirus after prophylactic vaccination with AS04-adjuvanted HPV-16/18 vaccine: Improving upon nature / Tino F. Schwarz, L. Oberdan – *Gynecologic Oncology.* – 2008. – Vol. 110. – S1–S10.

22. World Health Organization. WHO position on HPV vaccines // *Vaccine.* – 2009. – Vol. 27. – P. 7236–7237.

23. *Zur Hausen H.* Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application / Zur Hausen H. // *Nature Rev. Cancer.* – 2002. – Vol. 2. – P. 342–350.

THE STATE OF CELLULAR AND HUMORAL IMMUNITY IN GIRLS AFTER HPV VACCINATION

N.V. Voznesenskaya, L.I. Trubnikova, T.U. Kornilova, M.L. Albutova

Ulyanovsk State University

This research is devoted to study of the state of cellular and humoral immunity after vaccination against HPV girls, media co herpes infection. Ferment analysis of the surveyed prisoners through 6 months after the last vaccination was determined IgG, IgM, CD4, CD8, immunoregulatory index, phagocytosis. It is established that for girls' combined herpes infection reduces the activity of the formation of postvaccinal immunity.

Keywords: herpes infection, cytomegalovirus, Epstein-Barr virus human papilloma virus infection, vaccine, humoral immunity, cell-mediated immunity, vaccine-induced immunity.