

- or prolonged exposure therapy for post-traumatic stress disorder / L. L. Meyers, T. Q. Strom, J. Leskela [et al.] // Military Medicine. " 2013. " Vol. 178 (1). " P. 95–99.
23. Aleschenko V. I. Post-traumatic stress of servicemen - participants in hostilities: psychological analysis / V. I. Aleschenko // Bulletin of Taras Shevchenko Kyiv National University. Military special sciences. - 2015. - Issue 1. - P. 5-10.
24. Agaev H.A Psychological factors of adaptation of military personnel of the peacekeeping contingent to activities in special conditions: Diss. psychological sciences: 19.00.09. - K., 2006. - 195 p.
25. Aleshchenko V.I. Psychological rehabilitation of servicemen with post-stress mental disorders / Aleshchenko V.I., Khmilyar O.F. // Tutorial. -X.: HUPS, 2005. - 84 p.
- Вперше надійшла до редакції 16.06.2024 р.
Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування

УДК 616.891.6: 616.155.32: 612.017.11.

DOI: <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.13820860>

FAS-FASL ЯК КЛЮЧОВА СИСТЕМА ФУНКЦІОНУВАННЯ НАТУРАЛЬНИХ КІЛЕРІВ ПРИ ПОСТТРАВМАТИЧНОМУ СТРЕСОВОМУ РОЗЛАДІ

Зубченко С.О., Гаврилюк А.М., Кріль І.Й., Надіжко О.М.

*Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького
svitlana_zu@meta.ua*

FAS-FASL AS A KEY SYSTEM OF NATURAL KILLER FUNCTIONING IN POST-TRAUMATIC STRESS DISORDER

Zubchenko S.O., Havrylyuk A.M., Kril I.I., Nadizhko O.M.

*Danylo Halytsky Lviv National Medical University
svitlana_zu@meta.ua*

Summary/Резюме

Post-traumatic stress disorder (PTSD) is a debilitating mental condition that occurs after trauma as a result of a combination of factors. Disturbances in the functioning of the immune system, in particular, a change in the cytotoxic functions of natural killers (NK), are of great importance.

The *aim* of our study was to study the expression of receptor-ligand Fas-FasL on NK cells in patients with PTSD and human herpesvirus type 6 (HHV6) reactivation.

Materials and methods. 40 patients of both sexes with PTSD, aged 39.4 ± 6.7 years, participated in the study. Two comparison groups into 20 members were distinguished depending on the presence of DNA HHV6 in biological media identified by the PCR method. The control group consisted of 20 healthy members without DNA HHV6. The interaction in the Fas/FasL system was studied by determining the CD95 receptor (Fas/APO-1) and its ligand CD178 on NK cells.

Results. We found a statistically significant difference in the expression of receptors and ligands Fas-FasL on NK cells between the groups of PTSD patients with and without HHV6 reactivation, as well as the control group.

Conclusions. In patients with PTSD and reactivation of HHV6: 1) an imbalance develops between the normal antiviral functions of NK cells and their actual implementation; 2) there is a risk of damage to the structure and functioning of the central nervous system due to the formation of immunopathological disorders.

Key words: *post-traumatic stress disorder, immune system, natural killers, Fas-FasL, nervous system.*

Посттравматичний стресовий розлад (ПТСР) — це виснажливий психічний стан, який виникає після травми у результаті комплексу факторів. Велике значення при цьому мають порушення функціонування імунної системи, зокрема зміна цитотоксичних функцій натуральних кілерів (NK).

Метою нашого дослідження було вивчення експресії рецептор-ліганду Fas-FasL на NK-клітинах у пацієнтів з ПТСР і реактивацією герпесвірусу людини 6 типу (HHV6).

Матеріали і методи. У дослідженні брали участь 40 пацієнтів з ПТСР обох статей, віком $39,4 \pm 6,7$ років. Виокремлено 2 групи порівняння по 20 осіб залежно від наявності ДНК HHV6 у біологічних середовищах, ідентифікованих методом ПЛР. Контрольну групу склали 20 здорових осіб з ДНК HHV6 «-». Досліджували взаємодію у системі Fas/FasL шляхом визначення на NK-клітинах рецептора CD95 (Fas/APO-1) та його ліганда CD178.

Результати дослідження. Виявили статистично вірогідну різницю в експресії рецепторів і лігандів Fas-FasL на NK-клітинах між групами пацієнтів з ПТСР з і без реактивації HHV6, а також контрольною групою.

Висновки. У пацієнтів із ПТСР і реактивацією HHV6: 1) розвивається дисбаланс між нормальними противірусними функціями NK клітин і їх реальною реалізацією; 2) формується ризик пошкодження структури та функціонування ЦНС з формування імунопатологічних порушень.

Ключові слова: *посттравматичний стресовий розлад, імунна система, натуральні кілери, Fas-FasL, нервова система.*

Вступ

Посттравматичний стресовий розлад — це виснажливий психічний розлад, який виникає після травми. На сьогодні виділяють чотири групи симптомів, які характеризують ПТСР: повторне переживання травматичної події, уникнення ситуацій, що нагадують травматичну подію, порушення когнітивних функцій і настрою, підвищене збудження та реактивність. Причому не завжди присутні усі ці симптоми разом. Достатньо лише кілька з них і при їх тривалій наявності більше місяця у пацієнта формуються порушення у функціональному стані багатьох органів і систем. Вплив травматичної події є обов'язковим фактором розвитку ПТСР, але цього недостатньо, оскільки не у всіх після травми розвивається ПТСР [5, 7].

Комплексний фенотип ПТСР виникає внаслідок взаємодії між генетичними,

екологічними, інфекційними та іншими біологічними факторами ризику. Велике значення при цьому має стан імунної системи. Відомо, що дисрегуляція імунної системи може бути спричинена реактивацією так званих «млявих» опортуністичних герпесвірусних інфекцій. Неврологічні прояви часто пов'язують з впливом саме вірусу герпесу людини 6 типу (HHV6), який відноситься до родини в-герпесвірусів. Однією з можливих причин імунних порушень є зміна цитотоксичних функцій NK-клітин під впливом HHV6. Як відомо, в-герпесвіруси індують експресію рецепторів загибелі (Fas) на інфікованих ними клітинах господаря, які взаємодіють з FasL на NK-клітинах, що призводить до апоптозу заражених клітин [8]. Взаємозв'язок між імунною системою, реактивацією герпесвірусних інфекцій і формуванням ПТСР продовжує вивчатись. Розширення досліджень у цьому напрямку дасть можливість виявити осіб, які мають підвищений ризик розвитку ПТСР внаслідок реактивації HHV6.

Метою нашої роботи було вивчення експресії рецептор-ліганду Fas-FasL на NK-клітинах у пацієнтів з ПТСР і реактивацією HHV6.

Матеріали і методи

Дослідження проводилося відповідно до принципів сьомого перегляду Гельсінської декларації прав людини (2013), Конвенції Ради Європи про права людини і біомедицину та відповідні закони України. Дослідження ухвалені Комітетом з етики у Львівському національному медичному університеті імені Данила Галицького (протокол № 6 від 22.08.2022 р.). Усі пацієнти групи дослідження і контрольної групи підписали інформовані згоди.

Формування групи дослідження

Дослідження проходило на базі кафедри клінічної імунології та алергології Львівського національного університету імені Данила Галицького в період жовтень-грудень 2022 року. Критеріями включення були дорослі особи обох статей віком від 18 років до 65 років з даними анамнезу про перенесений стрес і наявністю післястресових симптомів, тривалістю більше 1 місяця. Для діагностики ПТСР використовували опитувальник NIMH, American National Center for PTSD (2013). Критерії виключення: особи, які до 1 міс. перенесли стресові події, діти, вагітні, пацієнти з аутоімунними, онкологічними та іншими хронічними процесами, гострими інфекційними хворобами тощо. Контрольну групу склали 20 здорових осіб відповідного віку та статі (ПТСР не діагностований і ДНК HHV6 не виявлено в жодному біологічному середовищі).

Виявлення ДНК HHV6 у трьох біологічних середовищах (кров, слина та слизова ротоглотки) проводили за допомогою Applied biosystems 7300 real-time PCR systema, використовуючи TaqMan Universal PCR Master Mix. Він базувався на використанні специфічних праймерів для ампліфікації вірусу і кількісного визначення геномних ділянок патогену [21].

Для ідентифікації взаємодії у системі Fas/FasL на NK-клітинах визначали рецептор CD95 (Fas/APO-1) та його ліганд CD178.

Статистичний аналіз проводили за t-критерієм Стюдента з порівнянням двох незалежних груп, у випадку коли тест відповідав нормальному розподілу (розподіл Гаусса). Незалежний t-тест вибірки проводили для порівняння між досліджуваною групою пацієнтів та контрольною групою. У разі ненормального розподілу статистичні розрахунки проводили за допомогою непараметричного U-критерію Манна-Уїтні для порівнюваних груп. Достовірна різниця між групами вважається 95 %.

Результати дослідження

На першому етапі нашої роботи нами було виявлено і описано, що у 36 осіб, яким за даними опитувальника верифіковано ПТСР (63,9 % жінок і 36,1 % чоловіків, середній вік $39,4 \pm 6,7$ років), найчастіше (78,1 %) серед інших досліджених герпесвірусів (EBV, CMV, HHV1/2) була ідентифікована реактивація HHV6.

Тому для досягнення мети даного етапу пілотного дослідження ми вирішили детально розглянути зміни в роботі імунної системи на тлі реактивації саме HHV6. Усі пацієнти були поділені на групи порівняння:

1 група — 20 осіб з діагностованим ПТСР і реактивацією вірусу (ДНК HHV6 «+» мінімально в двох середовищах)

2 група — 20 осіб з діагностованим ПТСР без реактивації вірусу (ДНК HHV6 «-» у всіх досліджуваних середовищах)

3 група (контрольна) — 20 осіб без ПТСР і без реактивації вірусу (ДНК HHV6 «-» у всіх досліджуваних середовищах)

У групах дослідження визначали експресію рецепторів Fas (CD56+/95+), FasL (CD56+/178+) на NK клітинах. Дані подано в таблиці 1.

Як продемонстрували результати порівняльного аналізу — експресія рецептора CD56+/95+ (Fas) була найнижчою

Таблиця 1 клітин [2]. HHV6

Експресія рецепторів Fas (CD56+/95+), FasL (CD56+/178+) на NK клітинах у пацієнтів з ПТСР з/без реактивації HHV6

Показники	ПТСР «+» HHV6	ПТСР «-» HHV6	Контрольна група	Вірогідність між групами, $p < 0,05$		
	1-а (n = 20)	2-а (n = 20)		1-2	1-3	2-3
CD95+	3,22 ± 1,45	4,86 ± 2,62	5,10 ± 2,14	0,019	0,002	0,752
CD178+	4,22 ± 2,34	3,11 ± 1,58	2,23 ± 1,44	0,086	0,003	0,073
CD56 total	9,13 ± 3,51	10,84 ± 4,34	12,73 ± 5,02	0,178	0,012	0,211

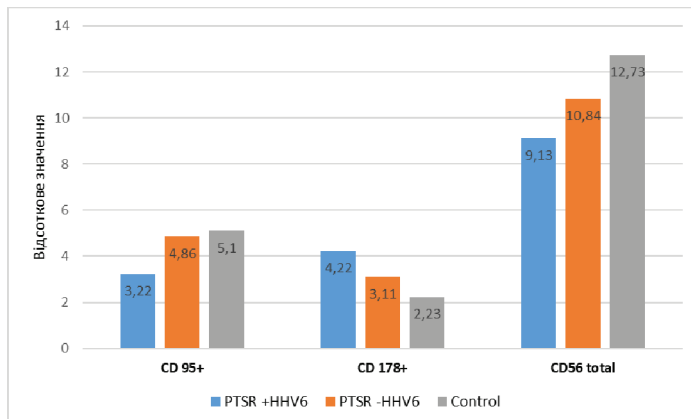


Рис. 1 Порівняльний аналіз експресії Fas-FasL на NK клітинах у пацієнтів з ПТСР з/без реактивації вірусу герпесу людини 6 типу

у 1-й групі пацієнтів з ПТСР і реактивацією HHV6, що було вірогідно менше порівняно з 2-ю ($p < 0,05$) і 3-ю контрольною ($p < 0,05$) групами.

За результатами визначення експресії ліганду CD56+/178+ (FasL) встановлено, що між групами пацієнтів з ПТСР з/без реактивації HHV6 не було статистично значущої різниці. Однак експресія FasL була майже в 2 рази меншою у здорових осіб контрольної групи порівняно з пацієнтами з ПТСР і реактивацією HHV6 ($p < 0,05$).

Щодо загальної кількості NK (CD56 total), то як і слідувало очікувати, їх рівень був найвищим у здорових осіб контрольної групи, в т.ч. в 1,4 разів вищим ($p < 0,05$) порівняно з пацієнтами з ПТСР і реактивацією HHV6, рис. 1.

Дискусія

Вірус герпесу людини 6 типу є ДНК-вірусом і, як усі інші в-герпесвіруси, може ремоделювати функції NK-

статусом активації беруть участь у кліренсі HHV6 у мозку. У той же час, HHV6 може модулювати імунітет господаря, вбиваючи лімфоцити та контролюючи синтез цитокінів [8]. Не виключено, що ця складна взаємодія між HHV6 та імунною відповіддю може сприяти розвитку ПТСР.

Незважаючи на те, що сукупність вищезгаданих досліджень є дещо суперечливою, однак більшість з них вказують на імунні зміни при ПТСР, а саме — порушення імунологічного балансу у бік прозапального стану. Це підтверджується підвищеними рівнями прозапальних цитокінів IFN- γ , IL-6, TNF- β та IL-17 у плазмі крові пацієнтів з ПТСР, а також підвищеними рівнями імуностимулюючих Th1 і запальних Th17 клітин у крові [4, 11, 16-18, 20]. Підвищення рівня прозапальних медіаторів IL-12 та IFN- γ у плазмі пацієнтів з ПТСР пов'язане з численними генетичними та епігенетичними модифікаціями мононуклеарних клітин

периферичної крові та ремоделюванням NK клітин [3]. Власне NK здійснюють функцію імунного нагляду, лізуючи клітини-мішені самостійно без попередньої сенсibiliзації. Знищення клітин-мішеней відбувається за участі перфоринів і гранзимів (серинових протеаз), які містяться у цитолітичних зернах цих клітин. Однак, використовуються й інші механізми. Зокрема, завдяки експресії молекул FasL і TRAIL на NK клітинах індукується апоптоз вірусинфікованих чи пухлинних клітин у людському організмі [10].

Схоже, що вірус HHV6 отримує користь від шляху Fas-FasL, що сприяє його персистенції та розповсюдженню по всій центральній нервовій системі (ЦНС) [14]. FasL (мембранний інтегральний білок) індукуює апоптоз через Fas — рецептор загибелі, який знаходиться на мембрані клітини [6]. Основними функціями FasL є 1) індукція апоптозу вірусинфікованих клітин; 2) негативна регуляція імунної відповіді (доведення до апоптозу активованих Т-лімфоцитів) [19]. Fas і FasL активують клітини, які реалізують запальний процес, зокрема нейтрофіли. Виділяються прозапальні цитокіни, внаслідок цього нейтрофіли та макрофаги мігрують у запальні тканини та інфільтрують їх. Неконтрольоване запалення, опосередковане Fas-FasL, спричиняє дисрегуляцію імунної відповіді, руйнування тканин і порушення їх функціонування (особливо нервової системи). Внаслідок гіперактивації системи Fas-FasL пошкоджується ЦНС, так як гинуть нейрони та втрачається провідність через нервові синапси [9]. Крім цього, наявність інфекції у ЦНС «відміняє» її імунологічну привілейованість, що створює ризик запуску автоагресії [13].

За нашими результатами, як і слідувало очікувати, у пацієнтів з ПТСР загальна кількість NK, які володіють функцією розпізнавання і знищення вірусинфікованих клітин, була нижчою за контрольну групу, особливо — у пацієнтів з ПТСР і реактивацією HHV6. Це у першу чергу вказує на виснаження і пригнічення

клітинної ланки імунної відповіді. Нами також було визначено, що експресія CD56⁺/95⁺ (Fas) у пацієнтів 2-ї групи з ПТСР без HHV6 була вищою, ніж у пацієнтів 1-ї групи з реактивацією HHV6 і нижчою порівняно з контрольною групою. Експресія CD56⁺/178⁺ (FasL) у пацієнтів без HHV6 була нижчою, ніж у пацієнтів з реактивацією HHV6. Проте обидва показники були нижчими, ніж у контрольній групі здорових осіб (рис. 1). Відтак у всіх пацієнтів з ПТСР спостерігалось зниження експресії Fas і достовірне підвищення експресії FasL. Виявлено набагато сильнішу цитотоксичну активність при реактивації HHV6. Тому ми припустили зв'язок між реактивацією HHV-6 і клінічними симптомами неврологічних порушень у пацієнтів з ПТСР. Ймовірно це може спричинити більш значне руйнування інфікованих вірусом імунокомпетентних клітин і клітин нервової системи.

Отже, у ЦНС Fas-FasL є частиною її комплексної регуляції при локальних запальних реакціях, зокрема, при герпесвірусній інфекції. Дисфункція системи Fas-FasL призводить як до розладів противірусної імунної відповіді, так і до посилення нейрозапалення [14].

Висновки

Таким чином у результаті нашого дослідження ми отримали дані про те, що у пацієнтів із ПТСР і реактивацією HHV6: 1) розвивається дисбаланс між нормальними противірусними функціями NK клітин і їх реальною реалізацією; 2) формується ризик пошкодження структури та функціонування ЦНС і формування імунопатології, з великою ймовірністю автоімунної. Щоб підтвердити цю гіпотезу, ми продовжуємо пілотне дослідження. При отриманні подальших достовірних результатів виглядає доцільним рекомендувати імуномодуючу терапію з додаванням противірусних таргетних препаратів для пацієнтів з ПТСР і реактивацією HHV6.

Стаття не містить **конфлікту інтересів**.

Література/References

- Almine JF, O'hare CA Dunphy G, et al. IFI16 and cGAS cooperate in the activation of STING during DNA sensing in human keratinocytes. *Nat. Commun.* 2017; 8: 14392. doi: 10.1038/ncomms14392.
- Azzi T, Lunemann A, Murer A, et al. Role for early-differentiated natural killer cells in infectious mononucleosis. *Blood.* 2014; 124: 2533–2543. doi: 10.1182/blood-2014-01-553024.
- Bam M, Yang X, Zhou J, Ginsberg JP, Leyden Q, Nagarkatti PS et al. Evidence for epigenetic regulation of pro-inflammatory cytokines, interleukin-12 and interferon- γ , in peripheral blood mononuclear cells from PTSD patients. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2016; 11: 168–81. doi: 10.1007/s11481-015-9643-8.
- Cohen M, Meir T, Klein E, Volpin G, Assaf M, Pollack S. Cytokine levels as potential biomarkers for predicting the development of posttraumatic stress symptoms in casualties of accidents. *Int J Psychiatry Med.* 2011; 42: 117–31. doi: 10.2190/PM.42.2.b.
- Creamer M, Burgess P, McFarlane AC. Post-traumatic stress disorder: findings from the Australian National Survey of Mental Health and Well-being. *Psychol Med.* 2001; 31: 1237–47. doi: 10.1017/S0033291701004287.
- De la Roche M, Asano Y, Griffiths GM. Origins of the cytolytic synapse. *Nature Rev. Immunol.* 2016; 16: 421–432. doi: 10.1038/nri.2016.54.
- Dursa EK, Reinhard MJ, Barth SK, Schneiderman AI. Prevalence of a positive screen for PTSD among OEF/OIF and OEF/OIF-era veterans in a large population-based cohort. *J Trauma Stress.* 2014; 27: 542–9. doi: 10.1002/jts.21956.
- Eliassen E, Di Luca D, Rizzo R et al. The Interplay between Natural Killer Cells and Human Herpesvirus-6. *Viruses.* 2017; 9 (12) 367–375. doi: 10.3390/v9120367.
- Forrester JV, McMenamin PG, Dando SJ. CNS infection and immune privilege. *Nature Reviews Neuroscience* volume. 2018; 19: 655–671. doi: 10.1038/s41583-018-0070-8.
- Goodridge JP, Unfelt B, Malmberg KJ (2015) Newtonian cell interactions shape natural killer cell education. *Immunol Rev.* 267 (1): 197–213. doi: 10.1111/imr.12325.
- Guo M, Liu T, Guo JC, Jiang XL, Chen F, Gao YS. Study on serum cytokine levels in posttraumatic stress disorder patients. *Asian Pac J Trop Med.* 2012; 5: 323–5. doi: 10.1016/s1995-7645(12)60048-0.
- Izzo R, Soffritti I, D'Accolti M, et al. HHV-6A/6B infection of NK cells modulates the expression of miRNAs and transcription factors potentially associated with impaired NK activity. *Front. Microbiol.* 2017; 8: 2143. doi: 10.3389/fmicb.2017.02143.
- John V. Forrester, Paul G. McMenamin, Samantha J. Dando CNS infection and immune privilege. *Nature Reviews Neuroscience.* 2018; 19: 655–671.
- Krzyzowska M, Kowalczyk A, Skulska K. Fas/FasL Contributes to HSV1 Brain Infection and Neuroinflammation. *Front. Immunol.* 2021; 12: 1–5. doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.714821>.
- Munz C. Human γ -Herpesvirus Infection, Tumorigenesis, and Immune Control in Mice with Reconstituted Human Immune System Components. *Front. Immunol.* 2018; 9: 1–5. doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00238>.
- Sommershof A, Aichinger H, Engler H, Adenauer H, Catani C, Boneberg EM, et al. Substantial reduction of naive and regulatory T cells following traumatic stress. *Brain Behav Immun.* 2009; 23: 1117–24. doi: 10.1016/j.bbi.2009.07.003.
- von Kanel R, Hepp U, Kraemer B, Traber R, Keel M, Mica L, et al. Evidence for low-grade systemic proinflammatory activity in patients with posttraumatic stress disorder. *J Psychiatr Res.* 2007; 41: 744–52. doi: 10.1016/j.jpsychires.2006.06.009.
- Wang Z, Mandel H, Livingston CA, Young MR. An exploratory approach demonstrating immune skewing and a loss of coordination among cytokines in plasma and saliva of veterans with combat-related PTSD. *Hum Immunol.* 2016; 77: 652–7. doi: 10.1016/j.humimm.2016.05.018.
- Yamada A, Arakaki R, Saito M, et al. Dual Role of Fas/FasL-Mediated Signal in Peripheral Immune Tolerance. *Front. Immunol.* 2017; 8: 1–6. doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00403>.
- Zhou J, Nagarkatti P, Zhong Y, Ginsberg JP, Singh NP, Zhang J, et al. Dysregulation in microRNA expression is associated with alterations in immune functions in combat veterans with post-traumatic stress disorder. *PLoS One.* 2014; 9: e94075. doi: 10.1371/journal.pone.0094075.
- Zubchenko S.O., Krill I.Y., Nadizhko O.M., Chopyak V.V. Prevalence of herpesvirus infections among patients with post-traumatic stress disorder: data from a pilot project. *Immunology and allergology: science and practice.* 2022; 3-4: 5–13.

Зубченко С.О., Кріль І.Й., Надіжко О.М., Чоп'як В.В. Поширеність герпесвірусних інфекцій серед пацієнтів з посттравматичними стресовими розладами: дані пілотного проекту. *Імунологія та алергологія: наука і практика.* 2022; 3-4: 5–13.

*Вперше надійшла до редакції 16.06.2024 р.
Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування*