

А.Б. Конькова-Рейдман ¹, В.И. Злобин ^{2,3},
С.Н. Теплова ^{1,4}

МАРКЕРЫ ИММУНОПОСРЕДОВАННОГО ВОСПАЛЕНИЯ В ЛИКВОРЕ И КРОВИ У БОЛЬНЫХ КЛЕЩЕВЫМИ НЕЙРОИНФЕКЦИЯМИ

¹ ГОУ ВПО «Челябинская государственная медицинская академия»

² ГУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, Москва

³ ГОУ ВПО Иркутский государственный медицинский университет

⁴ Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург

Клещевые нейроинфекции (клещевой энцефалит, нейроборрелиоз и их сочетанные формы) приводят к формированию иммунного ответа, как на системном уровне, так и на уровне ЦНС [7]. Исследование иммунных клеток и уровня иммунных молекул в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) при нейроинфекциях свидетельствуют об активном участии нейроглии, астроцитов мозга в инициации и развитии воспаления в ЦНС в условиях патологии [1, 14].

Целью настоящей работы явилось количественное изучение клеточных и молекулярных маркеров иммуноопосредованного воспаления в спинномозговой жидкости, в сыворотке крови у больных с верифицированными клещевыми нейроинфекциями (нейроборрелиозом, КЭ и клещевой микст-инфекцией) для уточнения патогенеза развития воспаления в ЦНС.

Материалы и методы исследования

Обследовано 140 человек. В исследование были включены больные с верифицированными формами клещевых нейроинфекций. Из них 90 больных с менингеальными и 27 с очаговыми формами клещевого энцефалита, 7 больных с нейроборрелиозом и 16 больных микст-инфекцией (сочетание эритемной и безэритемных форм ИКБ с менингеальной или менингоэнцефалитической формами КЭ). Этиологическая

верификация проводилась с использованием дискриминаторных для каждой патологии прямых и непрямых методов диагностики, включая молекулярно-генетический (ПЦР) с тест-системой «Вектор-Лайм-ДНК-ампли» производства «Вектор-Бест» с системой праймеров к антигену р41(Flab) и серологические методы (ИФА): тест-системы «Боррелиоз- ИФА-Ig M» и «Боррелиоз- ИФА-Ig G» производства НПФ «Хеликс» (Санкт-Петербург), тест-система для индикацию специфических антител классов Ig M и Ig G к вирусу КЭ производства «Вектор-Бест».

Популяционный и субпопуляционный спектр лимфоцитов ликвора изучали методом лазерной проточной цитометрии на цитофлюориметре фирмы «Beckman Coulter», модель Epics XL с использованием моноклональных антител фирмы «CALTAG Laboratories» против CD3, CD4, CD8, CD20, CD14, CD33, CD95, CD16+56. Количественную оценку содержания оксида азота (NO) в ликворе и крови проводили фотоколориметрическим методом с помощью реакции Грисса в модификации Коробейниковой Э.Н. [2002] по суммарному содержанию конечных стабильных метаболитов оксида азота. Общую активность комплемента ликвора и крови определяли по 50% гемолизу, а активность компонентов классического пути активации системы (C1-C5) -методом молекулярного гемолитического титрования. Определение содержания субклассов IgG (G1-G4), уровня TNF-α и белков теплового шока (ферритина) в ликворе и сыворотке крови проводилось методом ИФА (с помощью тест-систем фирмы «Вектор-Бест» и «Биохиммак», соответственно). Для статистической обработки результатов использовались стандартные методы вариационной статистики в рамках программного обеспечения Statistica for Windows, версия 5,5. Для проверки «нулевой» гипотезы использовали непараметрические критерии Манна – Уитни, Колмогорова-Смирнова. Различия между группами считали статистически достоверными при P<0,05.

Результаты

На основе рутинного цитологического и биохимического исследования ликвора у больных клещевыми нейроинфекциями в общей группе выявлено повышение общего количества клеток в ликворе и лимфоцитарный плеоцитоз. Общее количество клеток в ликворе пациентов было максимальным при нейроборрелиозе ($Me=360$ клеток/мл) и минимальным при КЭ ($Me=107$). Для клеточного состава ликвора при всех изучаемых клещевых нейроинфекциях было характерным превалирование лимфоцитов, число которых достигало уровня 80-91 клеток/мл, при минимальном содержании нейтрофильных клеток (от 9 до 20) при анализируемых вариантах нейроинфекций.

При обследовании ликвора 10 больных КЭ и 3 с микст – инфекцией с помощью проточной цитофлуориметрии установлено в спинномозговой жидкости (рис 1) преобладание мононуклеарных клеток, при этом CD3 лимфоциты составили 58%, а CD14 клетки - 34,4%. Количество CD4 лимфоцитов достигало 57,2%, число CD8 клеток было значительно меньше и составило всего 16,8%. Число CD20-лимфоцитов было минимальным (2,62%), а количество CD16+CD56+ клеток составило 7,68%. В исследуемой группе больных процент лимфоцитов ликвора, экспрессирующих рецептор готовности к Fas-зависимому апоптозу (CD95), был очень высоким и составил 64,3 %. Результаты проточного цитофлуориметрического анализа клеток ликвора у больного нейроборрелиозом (поражение ЦНС по типу менингоэнцефалита) показали, что содержание CD3+CD4-клеток в ликворе пациента было очень высоким и составило 77,2%, число CD8- клеток - 13,7%, процент В-лимфоцитов достигал 1,74 %, CD14+ клеток - 43,8 %.

Результаты определения уровня TNF-а, оксида азота, белков теплового шока, активности системы комплемента в сыворотке крови и ликворе представлены в таблицах 2,3,4. Как следует из материалов таблицы 2, у больных клещевыми нейроинфекциями в остром пе-

риоде наблюдалось достоверное увеличение концентрации конечных стабильных метаболитов оксида азота (NO_2 , NO_3 , NO_x). В полном соответствии с результатами анализа сыворотки крови находятся полученные нами данные об усилении нитроксидергических процессов на уровне ЦНС (табл.3). Выявленная гиперпродукция NO на уровне ЦНС может объяснять активацию готовности лимфоцитов к апоптозу, установленную на основании определения CD95 мембранного рецептора в 65% клеток ликвора. Выявлен существенный рост в остром периоде изучаемых нейроинфекций содержания TNF-а по сравнению с группой контроля (табл.2), который способен через соответствующие рецепторы также инициировать рецептор-зависимый апоптоз клеток. В сыворотке крови у больных клещевым энцефалитом, нейроборрелиозом и клещевой микст-инфекцией нами было выявлено достоверное уменьшение концентрации субклассов G3 и G4 в сравнении с контрольной группой. При сопоставлении уровней IgG1-G4 в крови в ликворе пациентов установлено, что соотношение иммуноглобулинов изучаемых субклассов в сравниваемых биологических жидкостях сопоставимо, максимум в обеих жидкостях установлен для IgG1, далее в порядке убывания располагаются IgG2, IgG3, IgG4 субклассы. Иммуноглобулиновый индекс (ИИ), который рассчитывается как $IgG\text{ СМЖ} / IgG\text{ сыворотки} * 1000$, для всех субклассов Ig G составлял от 2,3 до 2,9, что свидетельствует об активации интрацеллюлярного синтеза Ig G. Это мнение подкрепляется еще и сведениями о том, что иммунная реакция, возникшая в СМЖ на вирусные и бактериальные агенты, часто является олигоклональной. Молекулы Ig G достаточно долгоживущие, способные фиксировать комплемент. Этот класс иммуноглобулинов вырабатывается плазматическими клетками ликвора, а также клетками, похожими на активированные В-лимфоциты, содержащими в небольшом количестве компоненты гранулярного эндоплазматического ретикула [20, 21].

В рамках проводимого анализа важно было изучить состояние системы комплемента, патогенетическая роль компонентов которого в гибели нейронов отмечается целым рядом авторов. В сыворотке крови больных клещевыми нейроинфекциями в остром периоде отмечено снижение активности C2, C5 компонентов комплемента по сравнению со здоровыми лицами, что может быть связано с потреблением компонентов комплемента при образовании и элиминации антигенов и ЦИК. Достоверных изменений общей активности комплемента и его компонентов в ликворе не отмечается.

Определение белков теплового шока (ферритина) в крови позволило выявить достоверный рост уровня данных белков, являющихся показателем повреждения клеток экзогенными и эндогенными агентами, особенно при тяжелом течении нейроинфекции, достигающих значений 1291 нг/мл. Норма показателя ферритина в ликворе у лиц без признаков нейроинфекции, по данным Сумной Д.А., составляет 3.9 ± 0.6 нг/мл. Установленные нами средние уровни ферритина в ликворе при клещевых нейроинфекциях превышали эти значения четырехкратно.

Обсуждение

В результате проведенных исследований при клещевых нейроинфекциях с помощью рутинных методов оценки клеток ликвора подтверждены данные об общем росте клеток в СМЖ за счет мононуклеаров с формированием характерного для данных инфекций лимфоцитарного плеоцитоза, что является характерным дифференциально-диагностическим признаком клещевых нейроинфекций. С помощью проточной цитофлюориметрии выявлено формирование в СМЖ не только лимфоцитарного плеоцитоза (роста CD3, CD4, CD8), но и моноцитоза (число CD14+ клеток составило - 34%). Преимущественный рост в ликворе мононуклеаров (CD14+ клеток и популяции CD4 лимфоцитов) и преобладание их в воспалительном экссудате характерны для Th-1-зависимого типа иммунопосредованного

воспаления, что не исключает участия CD8-цитотоксического действия лимфоцитов, численность которых в СМЖ в 8 раз превысила число В-клеток.

К впервые выявленным особенностям клеточного состава ликвора у больных клещевыми нейроинфекциями следует отнести высокое содержание лимфоцитов с маркером CD95, отражающее готовность клеток к Fas-опосредованному рецептор-зависимому апоптозу. Увеличение числа лимфоцитов в ликворе с готовностью к апоптозу может быть связано с выявленной в крови и ликворе повышенной продукцией NO, определяемого по содержанию конечных стабильных метаболитов оксида азота. Известно, что продукция NO осуществляется с помощью нейрональной NO-синтазы, а также индуцибельной ее формы, источником которой являются эндотелиоциты и в основном моноциты и макрофаги [3,4,11], о росте уровня которых свидетельствует увеличение CD14+ клеток в СМЖ у пациентов. Известно, что синтез i-NOS индуцируется под воздействием микробных антигенов, TNF- α , гамма-интерферона. [9,10,13]. Рост метаболитов NO зафиксирован также на уровне крови, что позволяет предполагать вазодилатационный эффект NO и связанный с ним рост проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) с распространением NO как газового мессенджера по объему с преодолением барьера по градиенту концентрации. Локальное действие NO на иммунные клетки может оказывать прямой апоптогенный эффект, описанный многими авторами для данного соединения и его метаболитов, и согласуется с полученными нами данными о достоверно высоких показателях готовности лимфоцитов ликвора к Fas-зависимой программированной гибели. Несомненную значимость для патогенеза развития поражений ЦНС при клещевых нейроинфекциях могут иметь флогенные эффекты оксида азота и его синергистов (TNF- α и система белков комплемента). Четкой прямой связи между активностью комплемента и содержанием общего белка в спинномозговой

жидкости нами не установлено. Данное наблюдение согласуется с результатами исследования Henningsson A.J. на 298 пациентов с нейроборрелиозом, на основании которого были получены убедительные доказательства активации комплемента по классическому пути с повышением концентрации C1, C4, C3, C3a в ликворе. Между активностью комплемента в сыворотке крови и ликворе также не было выявлено корреляции, что согласуется с данными Малашкия Ю.А. и не позволяет связывать уровень активности комплемента с увеличением проницаемости ГЭБ. Рост показателей активности системы комплемента в ликворе может быть связан с топической активацией системы комплексами антиген-антитело и с локальной продукцией белков комплемента элементами глии в ответ на антигенные стимулы [19].

Представляют особый интерес данные, характеризующие содержание «стресс-белков» в крови и ликворе пациентов. По данным литературы, в крови при инфекционных заболеваниях в течение первых 48 часов у всех больных, независимо от этиологии инфекционного процесса, уровень ферритина, который относится к БТШ и является маркером «клеточного стресса», повышается и достигает максимальных значений к концу 1-й недели ли-

хорадки за счет повышения внутриклеточного синтеза белка. Нами обнаружен достоверный рост ферритина в крови при тяжелом течении нейроинфекций в сопоставлении с контрольной группой здоровых доноров. При этом содержание ферритина в ликворе оказалось в 4 раза ниже, чем в сыворотке крови обследуемых пациентов. Повышение концентрации БТШ защищает клетку от апоптоза. В основе антиапоптогенного действия ферритина может лежать его способность связывать железо, тормозить избыточный синтез оксида азота, который обладает выраженным проапоптогенным действием. Факт обнаружения ферритина в спинномозговой жидкости и динамика его снижения к периоду реконвалесценции позволяет считать данный БТШ достаточно объективным маркером процессов повреждения клеток на уровне ЦНС при клещевых нейроинфекциях.

Таким образом, ликвор является средой, четко реагирующей на патологические процессы в ЦНС. Объективная лабораторная оценка состава иммунных клеток, БТШ, характера цитокин-нитроксидергической регуляции на уровне ликвора и крови при клещевых нейроинфекциях позволяет уточнить диагноз, выявить значимость отдельных клеточно-молекулярных механизмов патогенеза заболевания.

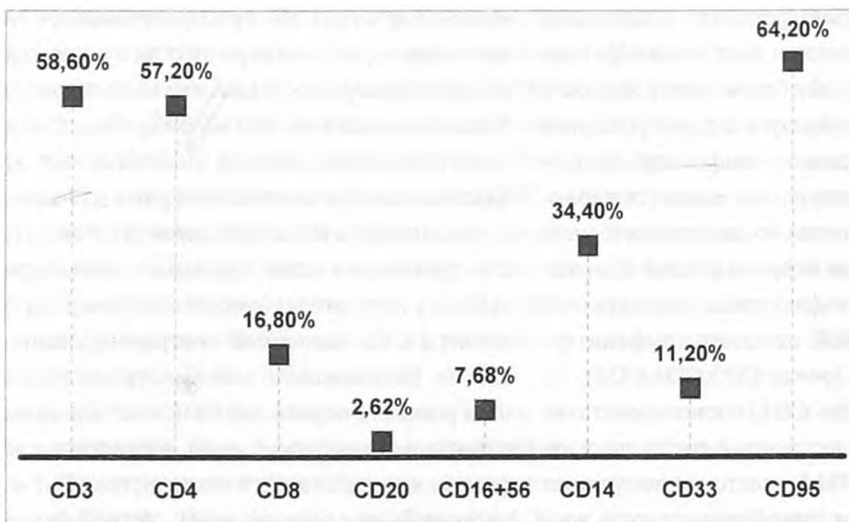


Рис.1. CD-типирование мононуклеаров ликвора у больных клещевыми нейроинфекциями (n=13)

Таблица 1

Содержание конечных стабильных метаболитов нитроксид-молекулы и TNF-альфа в сыворотке крови и ликворе пациентов в различные периоды заболевания в сопоставлении с контрольной группой

	Пациенты, острый период	Пациенты, период рек	Контроль (здоровые) (n= 30)	Достоверность отличий			
				Острый период		Период реконвалесценции	
				Me QL-QU	Me QL-QU	Me QL-QU	P(KS)
ФНО-альфа, пг/мл	12,27 0,00-19,56	13,73 0,00-22,70	0,32 0,22-0,40	P < 0,001	0,153	P < 0,001	p < 0,152
NO ₂ , мкмоль/л	5,14 4,15-7,25	3,35 2,30-5,70	3,70 3,20-4,04	p < 0,001	P < 0,001	P > 0,10	0,682
NO _x , мкмоль/л	28,40 24,60-33,97	20,10 17,30-22,70	13,40 11,34-14,40	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001
NO ₃ , мкмоль/л	22,55 18,44-28,20	15,45 14,00-18,50	9,30 8,30-10,50	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001

Примечание: NO₂ – нитриты, NO₃ – нитраты, NO_x – суммарная концентрация конечных стабильных метаболитов нитроксид-молекулы. KS- тест Колмогорова-Смирнова, MU- тест Манна-Уитни.

Таблица 2

Показатели нитроксидергических процессов в ликворе у больных с КЭ, ИКБ и микст-инфекцией

	Группа обследованных	Контроль	P		
			Me QL-QU	Me QL-QU	KS
NO ₂ , мкмоль/л	1,16 1,00-1,17	0,18 0,11-0,25		p > 0,10	0,103
NO _x , мкмоль/л	8,18 7,70- 8,70	1,41 1,03-1,80		p < 0,001	<0,001
NO ₃ , мкмоль/л	7,01 6,90- 7,30	1,23 1,0-1, 54		p < 0,001	<0,001

Таблица 3

Содержание ферритина в сыворотке крови и ликворе больных КЭ, ИКБ, МИ

Группы обследованных лиц	Сыворотка крови, нг/мл	Ликвор, нг/мл	Достоверность отличий	
			на системном уровне (P)	на локальном уровне (P)
Контрольная группа (1)	109, 06+ 5,2 n= 10	3,9+0,6 n= 10		
КЭ (2)	165,7+31,2 n= 30	32, 04+ 8,3 n= 15	P2-1 >0,1	P2-1 < 0,01
ИКБ (3)	215,4+ 21,4 n= 30	39 +4,0 n= 5	P3-1 < 0,001	P3-1 < 0,001
МИ (4)	220,6 + 31,9 n= 30	22,6+ 5,2 n= 10	P 4-1 < 0,001	P4-1 < 0,01

Таблица 4

Уровень содержания иммунных белков в ликворе больных клещевыми нейроинфекциями

Показатель	Пациенты. Острый период	Контроль	Достоверность отличий	
	Me QL-QU	Me QL-QU	p(KS)	P(MU)
Ig G1, г/л	31,0 25,600-32,7	22,59 17,280-24,3	P < 0,1	0,124
Ig G2, г/л	22,4 14,500-23,00	12,320 11,500-14,2	P < 0,1	0,605
Ig G3, г/л	6,56 4,500-7,200	3,680 3,150-5,900	P < 0,001	0,002
Ig G4, г/л	2,56 1,150-3,50	2,08 1,500-2,07	P < 0,1	0,124
СН50, у.е.	22,900 18,600-30,900	40,1	P < 0,1	0,124
С1, x108 ед.эфф.мол./мл	0,200 0,100-2,700	0,3	P < 0,1	0,165
С2, x108 ед.эфф.мол./мл	0,300 0,100-0,500	0,2	P < 0,1	P < 0,1
С3, x108 ед.эфф.мол./мл	0,500 0,100-1,900	0,3	P < 0,1	P < 0,1
С4, x108 ед.эфф.мол./мл	2,100 1,500-5,000	0,4	P < 0,1	P < 0,1
С5, x108 ед.эфф.мол./мл	1,100 0,400-2,400	0,2	P < 0,1	P < 0,1

ЛИТЕРАТУРА

1. Абрамов В.В., Абрамова Т.Я. Асимметрия нервной, эндокринной и иммунной систем. // Новосибирск. – 1996. – 97 с.
2. Базарный В.В. Принципы лабораторного исследования ликвора. Екатеринбург. 2003:18
3. Беляева И.А., Чехонин В.П., Гусев Е.И. и др. Гематоэнцефалический барьер // Журнал неврологии и психиатрии 1999.- № 8.- С 57-62.
4. Бредбери М. Концепция гематоэнцефалического барьера. Москва « Медицина» 1983: 273 с.
5. Емченко Н.Л., Цыганенко О.И., Ковалевская Т.В. Универсальный метод определения нитратов в биосредах организма// Клиническая лабораторная диагностика 1994.- № 6.-С.19-20.
6. Малашхия Ю.А., Надаерешвили З.Г. Мозг как орган иммунитета //Журнал неврологии и психиатрии 1999.- №9.- С. 64-69.
7. Малашхия Ю.А. Иммунный барьер мозга (иммунология и иммунопатология спинномозговой жидкости. М.: Медицина, 1986/- 256 с.
8. Одинак М.М., Дыскин Д.Е., Городов И.С. и др. Диагностика эпилепсии с помощью анализа крови на содержание аутоантител к нейрорецепторам глутамата. // Журнал неврологии и психиатрии – 1996. – №2. – С. 45-48.
9. Воје К., Arora P. Microglial –produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. J Brain Res 1992; 587: 250-256.
10. Brady T.S., Chang L.Y., Day B.J. et al. Extracellular superoxide dismutase is

- upregulated with inducible nitric oxide synthase after NF-kappa B activation. *J Physiol* 1997; 273(5):1002-1006.
11. Bredt D.S., Snyder S.H. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *J Neuron* 1994; 8 (1): 3-1.
 12. De Vries H. E., Blom-Roosemalen M.C.M., Oosten M.V. et al. The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro. *J Neuroimmunol* 1997; 64: 37-43.
 13. Fawcett J.W. Migratory process in CNS repair. // European Congress on Dialogue between Glia and Neurons. – Greece. – 1998. – №10. – P. 33.
 14. Henningsson A.J. Complement act. in Lyme neborreliosis/ *J. Neuroimmunol.* 2007.183 (1-2).
 15. Komatsu, T., Ireland, D. D. C., Chen, N. et al. Neuronal expression of NOS-1 is required for host recovery from viral encephalitis. *J Virology* 1999; 5: 87-89.
 16. Olsen C.W., Kehren J.C., Dybdahlsisoko N.R. Apoptosis as cause of death in measles virus-infected cell. *J Virol* 1996; 70: 663-666.
 17. Pape H.C., Mager R. et al. Neuronal NO-synthase as a factor of neuron activity. *J Neuron* 1999; 9: 441-448.
 18. Pelc S. Les lymphocytes B dans le liquide cephalorachidien des meningities virales. // *Rev. Med. Brux.* – 1981. – Vol. 2. – P. 277-280.
 19. Reid K.B. Activation and control of the complement system. // *Essays Biochem.* – 1986. – Vol. 22. – P. 27-68.
 20. Sunn T., Fleming J.O., Beresford H.R. et al. Synthesis of immunoglobulin within the central nervous system in multiple sclerosis and other neuroglial disease: Detection by analysis of CSF/Serum IgG Ratio. // *Amer. J. Clin. Pathol.* – 1981. – Vol. 76. – P. 458-462.
 21. Schuller E., Sagar H.J. Central nervous system IgG synthesis in multiple sclerosis. Application of a new formula. // *Acta Neurol. Scand.* – 1983. – Vol. 67, №6. – P. 365-371.

Ю.Г.Лагерева ¹, Я.Б.Бейкин ¹,
О.М.Оленькова ¹, М.Г.Топоркова ²

ИССЛЕДОВАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ И ГУ- МОРАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ ИММУНИ- ТЕТА В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И ЦЕРЕБРОСПИНАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ МЕНИНГЕАЛЬНОЙ ФОРМЕ КЛЕ- ЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

МУ «Клинико-диагностический Центр»,
МО «Новая больница», г. Екатеринбург

Введение

Острый менингит развивается в результате инфицирования вирусами клещевого энцефалита (ВКЭ) менингеальных оболочек мозга. Иммунологические реакции, приводящие к менингеальному воспалению, манифестируют в виде характерного симптомокомплекса, включающего: головную боль, лихорадку, ригидность мышц шеи и т.д. Иммунный ответ хозяина приводит к повышению проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), повышению уровня в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) таких цитокинов, как IL6, IFN γ , IL1 β , миграции активированных Т-клеток, предварительно активированных антигеном в периферических тканях и органах и инфильтрации В-лимфоцитами [9,10,14]. Антиген презентруется с помощью расположенных в центральной нервной системе (ЦНС) антиген-представляющих клеток CD8+ и CD4+ Т-лимфоцитам, В-лимфоциты синтезируют антиген-специфические антитела, моноциты-макрофаги участвуют в утилизации клеточного дегриса. Ключевую роль в нейтрализации и клиренсе РНК-вирусов, к которым принадлежит и вирус клещевого энцефалита, играют специфические антитела. В противовирусной защите участвуют также интерфероны первого типа и активированные CD8+ Т-клетки [11]. Продукция IFN γ CD4+ и CD8+ Т-клетками имеет решающее значение для контроля вирусной инфекции нейронов, которые экспрес-