

Хаманова Ю. Б.<sup>1</sup>, Фомин В. В.<sup>1</sup>, Сабитов А. У.<sup>1</sup>, Чеснакова О. А.<sup>1</sup>, Бейкин Я. Б.<sup>2</sup>

## Роль неспецифического звена иммунитета при менингеальной форме Коксаки В инфекции у детей

1 - ГБОУ ВПО УГМА Минздравсоцразвития России; 2 - МУ "Клинико-диагностический центр", г. Екатеринбург

*Khmanova Y. B., Fomin V. V., Sabitov A. U., Chesnakova O. A., Beykin Y. B.*

### The role of non-specific immunity at meningitis caused by enteroviruses Coxsackie group B in children

#### Резюме

В статье описываются результаты клинических и лабораторных исследований 109 детей с менингеальной формой Коксаки В инфекции. Этиологический диагноз был поставлен на основе вирусологических, серологических методов и обнаружение РНК энтеровирусов в цереброспинальной жидкости с помощью ПЦР. У детей при менингитах, вызванными энтеровирусами Коксаки группы В установлено два типа иммунного реагирования: при первом типе реакции в острую стадию заболевания гранулоцитопения компенсировалась увеличением функциональной активности цитокинпродуцирующих клеток и, наоборот, при втором типе иммунной реакции гранулоцитоз и активация поглотительной способности нейтрофилов возмещали сниженную активность лимфоцитов первого порядка.

**Ключевые слова:** дети, энтеровирусный менингит, неспецифический иммунитет

#### Summary

The paper describes the results of clinical and laboratory examinations of 109 patients with enterovirus coxsackie B meningitis. Etiological diagnosis was made on the basis of virologic, serologic methods detection in cerebrospinal fluid by PCR. In clinical picture predominated infectious, cerebral symptoms, meningeal signs, inflammatory changes in cerebrospinal fluid. In children with meningitis caused by enteroviruses Coxsackie group B has two types of immune responses: the first type of reaction in the acute stage, granulocytopenia was compensated by an increase in functional activity cytokine production T-cell and, conversely, the second type of immune response, granulocytosis, and activation of the absorptive capacity of neutrophils compensated reduced activity of lymphocytes the first order.

**Key words:** children, enteroviral meningitis, cell-mediated immunity

#### Введение

По современным представлениям, устойчивость организма к инфекционным воздействиям обеспечивается участием врожденных и приобретенных механизмов защиты. Система иммунитета имеет двойственную структуру, которая отражает её эволюционную историю. Она включает древний компонент палео-, являющийся врожденным иммунитетом, и более позднее филогенетическое приобретение, составляющее адаптивный иммунитет. «Рабочими» компонентами неспецифической (иннатной) иммунной системы служат макрофаги, моноциты, дендритные клетки, природные киллерные клетки и нейтрофилы, которые распознают единые (консервативные) молекулы патогенов и молекулы, экспрессируемые собственными клетками в случаях их инфицирования или опухолевого перерождения [1, 2]. Важнейшей составляющей комплекса ответных реакций организма на бактериальную и вирусную инфекцию являются реакции врожденного иммунитета. Основное значение в защите

от вирусных инфекций имеет клеточный иммунитет. Известно, что энтеровирусы вызывают супрессию иммунного ответа, причиной которой является репликация вирусов в лимфоцитах и моноцитах, что приводит к гибели Т-лимфоцитов, другим механизмом иммуносупрессии может быть нарушение синтеза интерферона клетками моноцитарно-макрофагальной системы, дисбаланс иммунорегуляции, приводящий к гиперактивности супрессорных клеток [1, 3]. Хотя иммунологические аспекты патогенеза развития менингитов подвергаются систематическому изучению в нашей стране и за рубежом, тем не менее, особенности развития защитных реакций организма при этих заболеваниях требуют дальнейшего изучения. Недостаточно изученным является вопрос о роли нейтрофилов в иммунных реакциях при вирусных менингитах, несмотря на то, что исследователи, работающие над проблемой энтеровирусных менингитов, описывают преобладание в крови и ликворе нейтрофильных лейкоцитов на ранних стадиях заболевания [4-11].

**Целью** настоящей работы явилось установление типов иммунного реагирования в зависимости от стартовых показателей неспецифического иммунитета у детей при энтеровирусном менингите.

## Материалы и методы

Под наблюдением находилось 109 детей с Коксаки В менингитами в возрасте от трех до четырнадцати лет, госпитализированных в отделение нейроинфекций МУ «ГКБ №40». Был проведен комплекс лабораторно-диагностических мероприятий, который включал вирусологическое исследование фекальных проб и носоглоточных смывов, парные сыворотки, ПЦР ликвора, общий анализ крови, ликвора. Исследования проводились на базе МУ «Клинико-диагностического центр» (главный врач, д.м.н., профессор Я. Б. Бейкин). Для оценки иммунного статуса содержание лейкоцитов, лимфоцитов, гранулоцитов определялось с помощью гематологического анализатора Cobas Minos Stex (ABX). Фенотипирование лимфоцитов осуществлялось методом прямой иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител производства ООО "Сорбент" (г. Москва). Регистрация результатов проводилась методом лазерной проточной цитометрии на цитофлюориметре FACScan (Becton Dickinson). Для оценки внутриклеточного синтеза цитокинов мононуклеары периферической крови получали путем выделения на градиенте плотности фиколл-верографина (1,077 г/см<sup>3</sup>). Спонтанную продукцию ИЛ2, ИЛ4, ИФН- $\gamma$  и ФНО- $\alpha$  Т-лимфоцитами оценивали по истечении 4 часов инкубации в присутствии брэфельдина А при 37 °С, в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>. В качестве активатора для стимуляции внутриклеточного синтеза использовали РМА ("Sigma", 50ng/ml) плюс иономицин ("Sigma", 1 $\mu$ g/ml). Иммунофенотипирование проводили с использованием ФИТЦ-меченых анти-CD3-моноклональных антител (ООО "Сорбент", г. Москва) РЕ-конъюгированных анти-ИЛ2, ИЛ4, ИФН- $\gamma$  и ФНО- $\alpha$ -антител (Caltag). Для оценки внутриклеточного киллинга (бактерицидной активности лейкоцитов) и поглотительной активности нейтрофилов и моноцитов использовался метод, разработанный в лаборатории клинической иммунологии Института иммунологии Минздрава РФ.

Функционирование НАДФ-оксидазной системы нейтрофилов оценивали при помощи спонтанного НСТ-теста (Демин А. А., 1981). Статистическая обработка полученных данных проводилась на персональном компьютере при помощи пакета прикладных программ «Statistica 6.0» и «AtteStab», описание количественных признаков проводилось с использованием параметрических и непараметрических методов. Сравнение независимых групп по количественным признакам с нормальным распределением значений проводилось с использованием классического или модифицированного критерия Стьюдента. При сравнении независимых групп с ненормальным распределением значений одного или двух количественных признаков использовался непараметрический метод с помощью U-критерия Манна-Уитни. Сравнение групп по качественным признакам проводилось с использованием критерия Хи-квадрат Пирсона. Критический уровень значимости был принят  $p < 0,05$ . Результаты представлены в виде среднего арифметического значения M и ошибки среднего значения m. Определялась медиана Me с пределами колебаний Q25-Q75%.

## Результаты и обсуждение

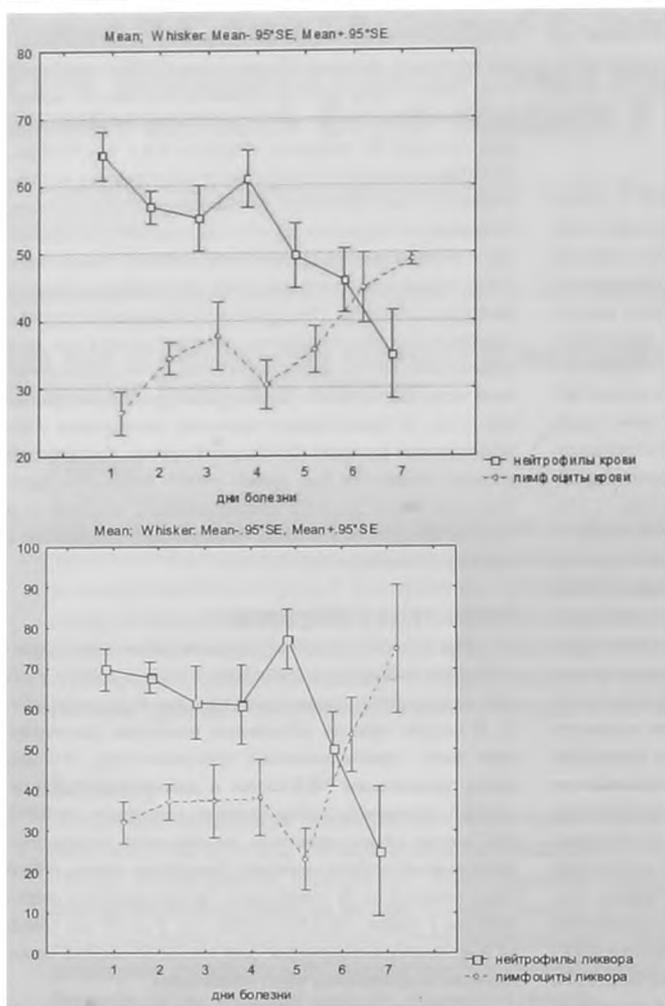
Проведенные нами исследования позволили охарактеризовать состояние неспецифического иммунитета у детей с менингитами, вызванными вирусами Коксаки В (табл. 1). В остром периоде заболевания изменения фагоцитарного звена характеризовались гранулоцитозом, моноцитозом, увеличением НКТ-клеток и повышением поглотительной активности нейтрофилов и моноцитов ( $p < 0,05$ ). НКТ-клетки служат значимым, но пока недостаточно изученным компонентом иннатного иммунного ответа, в процессе которого на их поверхности экспрессируются рецепторы как Т клеток, так и НК клеток [12]. У детей при Коксаки В-менингитах содержание этих клеток оставалось повышенным на протяжении всего заболевания.

В период санации ликвора в периферической крови сохранялся моноцитоз с увеличением клеток, активных в фагоцитарном тесте, отмечалось умеренное снижение натуральных киллеров по сравнению со здоровыми детьми, остальные параметры не отличались от нормы [] (табл. 1).

Таблица 1. Показатели неспецифического иммунитета при Коксаки В менингитах у детей

Показатель, x10 <sup>9</sup> /л	1-7 день болезни		16-23 день болезни		P
	M	m	M	m	
Гранулоциты	4,58†*	0,25	3,79	0,21	<0,05
Моноциты	0,50†*	0,02	0,56†*	0,02	
НСТсп, %	10,75	0,87	10,57	0,90	
НСТст, %	19,25	1,32	18,49	1,36	
БА, %	35,48	1,16	37,75	1,22	
Афмон	0,40†*	0,01	0,44†*	0,02	
АФ мон%	82,29	1,13	80,42	1,26	
АФ ней	4,19†*	0,48	3,38	0,16	<0,05
АФ ней%	91,24	0,64	91,73	0,58	
NK	0,39	0,03	0,36†*	0,03	
NKT-клетки	0,06†*	0,01	0,06†*	0,01	
CD3IFN $\gamma$ /ст.	0,15	0,01	0,16	0,01	
CD3IFN $\gamma$ /сп.	0,02†*	0,002	0,02†*	0,002	

Примечание. \* -  $p < 0,05$  - статистическая значимость отличий от нормативных показателей



**Рис.1.**Соотношение нейтрофилов и лимфоцитов крови при менингеальной форме Коксаки В инфекции у детей

**Рис.2.**Соотношение нейтрофилов и лимфоцитов ликвора при менингеальной форме Коксаки В инфекции у детей

Циркулирующие гранулоциты первыми из всех фагоцитирующих клеток организма вступают в контакт с чужеродным антигеном независимо от локализации воспалительного очага [1, 3] и ряд авторов указывает, что при энтеровирусном менингите в периферической крови у многих больных выявляется сдвиг лейкоцитарной формулы влево при нормальном или несколько увеличенном, реже несколько уменьшенном общем количестве лейкоцитов (у 29,1-35,4% больных) [5-11]. В нашей работе получены следующие данные – нейтрофильный плеоцитоз наблюдался у 88% больных, а нейтрофилез в крови у 63% детей преимущественно до 5-6 дня болезни (рис. 1, 2).

В нашем исследовании пациенты с Коксаки В менингитами были разделены на две группы – дети с гранулоцитопенией (n=19, первая группа) и с гранулоцитозом (n=38, вторая группа). В отличие от предшествующих исследователей, работающих над проблемой энтеровирусных менингитов [5-10], удалось установить более выраженную реакцию полиморфноядерных лейкоцитов и выявить два типа перестройки иммунной системы в ответ на вирусную инфекцию (табл. 2).

При первом типе реакции в острую стадию заболевания гранулоцитопения компенсировалась увеличением функциональной активности цитокинпродуцирующих клеток, преобладало число больных с активными Т-хелперами 1-го порядка, что свидетельствовало о доминировании клеточно-опосредованных механизмов иммунного ответа (64% против 31%,  $\chi^2=4,0$ ,  $p=0,04$ ). И, наоборот, при втором типе иммунной реакции гранулоцитоз и активация плотительной способности нейтрофилов возмещали сниженную активность лимфоцитов первого порядка. В динамике болезни все различия исчезали, за исключением уровня нейтрофильного лейкоцитоза, который оставался значительно выше у больных второй группы –  $4,28 \pm 0,33$  против  $2,86 \pm 0,30$  ( $p < 0,01$ ). При сопоставлении клинических данных, выявлено, что в первой группе больных отмечалось более постепенное начало болезни и средняя продолжительность менингеальных симптомов была короче –  $2,7 \pm 0,24$  дня, во второй группе чаще было острое начало болезни и большая длительность менингеальных симптомов –  $3,8 \pm 0,25$  дня ( $p < 0,01$ ). По уровню плеоцитоза и протейнорамии отличий не обнаружено (таблица 3).

**Таблица 2. Иммунологические показатели при Коксаки В-менингитах у детей с низким и высоким уровнем гранулоцитов крови**

Показатель, $\times 10^9/\text{л}$	I исследование				II исследование			
	Первая группа, n=19		Вторая группа, n=38		Первая группа, n=19		Вторая группа, n=38	
	M	m	M	m	M	m	M	m
Лейкоциты	5,50	0,43	8,17†*	0,49	6,23	0,43	7,50†*	0,32
Лимфоциты	2,05	0,15	2,33	0,12	2,84	0,20	2,65	0,12
Моноциты	0,50	0,03	0,51	0,03	0,53	0,05	0,57	0,04
Гранулоциты	2,40	0,16	5,15†*	0,41	2,86	0,30	4,28†*	0,33
NK	0,51	0,08	0,42	0,04	0,41	0,06	0,37	0,04
CD3HLADR%	2,33	0,48	1,25†*	0,18	3,33	1,17	1,80	0,36
CD3	1,46	0,15	1,54	0,09	2,01	0,14	1,86	0,10
CD4	0,79	0,07	0,81	0,06	0,96	0,11	0,94	0,07
CD8	0,74	0,11	0,63	0,04	0,86	0,11	0,77	0,04
АФ ней	2,26	0,14	4,53†*	0,34	2,64	0,26	3,73†*	0,25
CD3 <sup>+</sup> TNF $\alpha$ /ст.	0,87	0,16	0,52†*	0,04	0,71	0,09	0,61	0,05
CD3 <sup>+</sup> TNF $\alpha$ /сп.	0,08	0,01	0,07	0,01	0,08	0,01	0,08	0,01
CD3 <sup>+</sup> IL2 <sup>+</sup> /ст.	0,36	0,06	0,22†*	0,02	0,32	0,04	0,28	0,03
CD3 <sup>+</sup> IL2 <sup>+</sup> /сп.	0,06	0,01	0,05	0,01	0,05	0,01	0,05	0,01
CD3 <sup>+</sup> IL 4 <sup>+</sup> /ст.	0,09	0,02	0,06†*	0,01	0,08	0,01	0,07	0,01
CD3 <sup>+</sup> IL 4 <sup>+</sup> /сп.	0,06	0,01	0,06	0,01	0,05	0,01	0,05	0,01
CD3 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ /ст.	0,66	0,12	0,39†*	0,03	0,56	0,09	0,51	0,04
CD3 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ /сп.	0,06	0,01	0,05	0,01	0,07	0,02	0,05	0,01

Примечание. \* -  $p < 0,05$  - статистическая значимость отличий от нормативных показателей

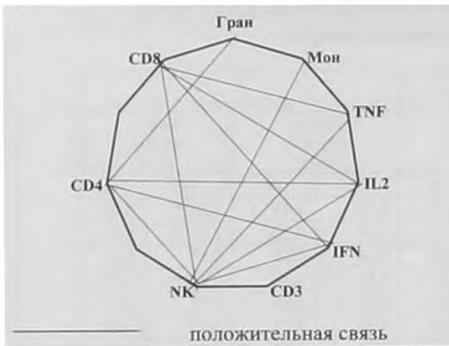
**Таблица 3. Характеристика состава цереброспинальной жидкости Коксаки В-менингитах у детей с низким и высоким уровнем гранулоцитов крови**

Показатель	Острый период						
	Первая группа, n=19			Вторая группа, n=38			p
	Me	Q25	Q75	Me	Q25	Q75	
Цитоз, ( $10^6/\text{л}$ )	192	77,00	484	167,50	28	362	>0,05
Нейтрофилы, ( $10^6/\text{л}$ )	116,5	50	383	73	16	215	>0,05
Лимфоциты, ( $10^6/\text{л}$ )	40	16	119	23	11	117	>0,05
Белок, (г/л)	0,38	0,28	0,53	0,39	0,27	0,56	>0,05
Период реконвалесценции							
	Me	Q25	Q75	Me	Q25	Q75	
Цитоз, ( $10^6/\text{л}$ )	13	7	27	13	9	15	>0,05
Нейтрофилы, ( $10^6/\text{л}$ )	5	3	8	2	1	4	>0,05
Лимфоциты, ( $10^6/\text{л}$ )	15,5	9,5	24	11	8	14	>0,05
Белок, (г/л)	0,32	0,21	0,40	0,34	0,20	0,38	>0,05

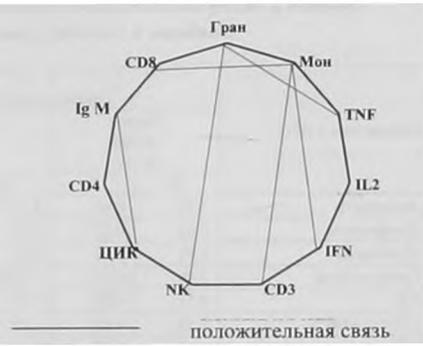
Косвенным отражением взаимодействия факторов неспецифической резистентности и адаптивного иммунитета является расчет коэффициентов корреляции между ними, числовые значения которых с определенной степенью вероятности отражают функциональное состояние иммунной системы в целом. Антигенная нагрузка при Коксаки В-менингитах у детей в первой группе (рис. 3) сопровождалась содружественными клеточными реакциями натуральных киллеров и CD8-лимфоцитов с Т-хелперами первого типа ( $r=0,65$ ,  $p<0,05$ ) на фоне взаимодействия гранулоцитов с CD4-лимфоцитами и моноцитов с NK-клетками ( $r=0,65$ ,  $p<0,05$ ), таким образом, в основном защита осуществлялась за счет активации перфорингранзимовых механизмов. Во второй группе больных (рис.3,4) выявлена активация гуморального иммунитета на фоне кооперации неспецифического звена с Т-клетками ( $r=0,6$ ,  $p<0,01$ ). Интенсивность взаимосвязей была выше в первой группе (13 против 6).

### Заключение

Таким образом, при Коксаки В-менингитах у детей, нами выявлены два типа иммунного реагирования в зависимости от уровня стартовых показателей гранулоцитов в крови. Установлено, что на ранней стадии болезни у большей части больных определяется нейтрофильный лейкоцитоз в крови (63%) и нейтрофильный плеоцитоз в ликворе (88%). В литературе мы не нашли данных, объясняющих роль этих клеток на начальной стадии энтеровирусной инфекции. Доказана роль данных клеток при бактериальных инфекциях, однако полученные нами данные позволяют думать о важной роли нейтрофилов на начальной стадии болезни и при вирусных инфекциях. Известно что в цитоплазме гранулоцитов содержится более 50 биологически активных веществ, что делает их способными выступать в качестве клеток, обладающих секреторной функцией, которые могут обеспе-



**Рис.3. Корреляционные связи в группе с низким стартовым уровнем гранулоцитов при менингеальной форме Коксаки В инфекции у детей**



**Рис.4. Корреляционные связи в группе с высоким стартовым уровнем гранулоцитов при менингеальной форме Коксаки В инфекции у детей**

чивать паракаринные механизмы взаимодействия с другими клетками, могут участвовать в иммунном ответе в качестве эффекторов, влияя на все этапы иммунного ответа, выполняя роль макрофагов, воздействуя на пролиферацию Т- и В- лимфоцитов, усиливая иммунный ответ [1, 13]. Нейтрофилы при менингеальной форме Коксаки инфекции выступают как клетки неотложной секреторной помощи, выполняя хелперную функцию, как макрофаги в гематоликторном барьере, обеспечивая благоприятное течение менингита. О важной роли неспецифического звена иммунитета в процессе выздоровления могут также свидетельствовать корреляционные связи между гранулоцитами крови и ликвора ( $r=0,4$ ,  $p<0,05$ ), высокие стартовые показатели кислородозависимого киллинга нейтрофилов и бактерицидной активности фагоцитов ( $r=0,4$ ,  $p<0,05$ ), а также содружественная реакция между натуральными киллерами и моноцитами, ( $r=0,5$ ;  $p<0,05$ ). Кроме того, активность моноцитарного фагоцитоза увеличивает презентацию антигена Т-хелперам и цитотоксическим лимфоцитам ( $r=0,4$ ;  $p<0,05$ ). Выявленные два типа иммунного реагирования можно учитывать при назначении «топической» иммунокорригирующей терапии

при менингитах, вызванных Коксаки В вирусами: относительным показателем является лимфопения на фоне гранулоцитоза. ■

*Хаманова Ю. Б., к.м.н., ассистент кафедры детских инфекционных болезней и клинической иммунологии ГБОУ ВПО УГМА Минздрава России, г. Екатеринбург; Фомин В. В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой детских инфекционных болезней и клинической иммунологии ГБОУ ВПО УГМА Минздрава России, г. Екатеринбург; Сабитов А. У., д.м.н., профессор, зав. кафедрой детских инфекционных болезней и клинической иммунологии ГБОУ ВПО УГМА Минздрава России, г. Екатеринбург; Чеснакова О. А., к.м.н., ассистент кафедры детских инфекционных болезней и клинической иммунологии ГБОУ ВПО УГМА Минздрава России, г. Екатеринбург; Бейкин Я. Б., д.м.н., профессор, главный врач МУ «Клинико-диагностический центр города Екатеринбурга», г. Екатеринбург; Автор, ответственный за переписку - Хаманова Юлия Борисовна, 620028, г. Екатеринбург, ул. Репина, д.3, Тел.: 8 (343)266-95-37, E-mail: hamanub@gmail.com*

**Литература:**

1. Ройт А. Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология; Пер с англ. В.И. Кандрора, А.Н. Маца, Л.А. Певниченко, М.А. Серовой. М.: Мир, 2000.
2. Бочаров Е.Ф., Ерман Б.А., Фомин В.В. и соавт. Энтеровирусная инфекция: Новые аспекты. Новосибирск: Наука. Сиб. Отделение; 1990.
3. Ивашкин В.Т. Основные понятия и положения фундаментальной иммунологии. РЖГГК. 2008; 18 (4):4-13.
4. Billiau A. Interferon- $\gamma$  in autoimmunity. Cytokine & Growth Factor. 1996; 7: 25- 34.
5. Ковтун О.П. Клинико-реозцефалографические критерии в оценке лечения и прогноза энтеровирусных менингитов у детей: Автореферат ... канд. мед. наук. Свердловск, 1984, 26 с.
6. Кожарская Г.В. Клинико-иммунологические критерии диагностики и лечения Коксаки В и ЕСНО-вирусных

7. менингитов у детей: дис. ... кан.мед.наук: 14.00.09. Екатеринбург, 1998.
7. Сорокина М. Н., Скрипченко Н. В. Вирусные энцефалиты и менингиты у детей. М.: МЕДИЦИНА, 2004.
8. Учайкин Г.Ф., Протасеня И.Н., Резник Е.В. и др. Энтеровирусные менингиты у детей Хабаровска в конце 20-го столетия. Эпидемиология и инфекц. болезней. 2003; 2:42-46.
9. Cherry J.D., Nielsen K.A. Aseptic meningitis and viral meningitis. - In: Textbook of Pediatric Infectious Diseases, Feigin R.D., Cherry J.D., Demmler G.J., Kaplan S.L. (eds). - WB Saunders, Philadelphia, 2004; 1:497-505.
10. Moral Gil L, Rubio Calduch EM, Broto Escapa P, Caballero Requero E, Calico Bosch I, Bertr6n Sangues JM. Enteroviral infections in children: clinical and

- epidemiological findings in 530 patients (1984-1991). *An Esp Pediatr.* 1993 Dec; 39(6):521-7.
11. Bonsu BK, Harper MB. Differentiating acute bacterial meningitis from acute viral meningitis among children with cerebrospinal fluid pleocytosis: a multivariable regression model. *Pediatr Infect Dis J.* 2004 Jun; 23(6):511-7.
  12. Фомин В.В., Бейкин Я.Б., Богданова Л.В., Лагерева Ю.Г. Иммунологические и гематологические показатели периферической крови у здоровых детей. Фомин В.В., Царькова С.А., Богданов В.А., редакторы. Актуальные проблемы детских инфекционных болезней. Сборник научных статей. Екатеринбург: Уральская государственная медицинская академия; 2001.
  13. Cassatella M.A. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today.* 1995; 16(1):21-26.