

2. В динамике болезни происходит снижение провоспалительных и повышение противовоспалительных цитокинов.

3. В процессе выздоровления играют роль оба звена иммунитета – в начальном периоде болезни преобладает клеточное звено, в периоде выздоровления – гуморальное.

Список литературы

1. *Кожарская Г. В.* Клинико-иммунологические критерии диагностики и лечения В5 и ЕСНО-вирусных менингитов / Дис... к.м.н. – Екатеринбург, 1998. – 130 с.

2. *Мазуров Д. В., Дамбаева С. В., Пинегин Б. В.* Оценка внутриклеточного киллинга стафилококка фагоцитами периферической крови с помощью проточной цитометрии // Иммунология. – 2000. – № 2. – С. 57–59.

3. *Фомин В.В., Чеснакова О.А., Ерман Б.А., Бейкин Я.Б.* Энтеровирусные нейроинфекции у детей. – Екатеринбург, 1991. – 173 с.

**В.В. Фомин, Ю.Б. Хаманова,
Я.Б. Бейкин, И.В. Михайлова,
Ю.Г. Лагерева**

*Уральская государственная
медицинская академия, ГKB № 40,
Институт иммунологии
и физиологии УрО РАН,
Центр лабораторной
диагностики*

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ГРАНУЛОЦИТОВ, МОНОЦИТОВ, Т-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ МЕНИНГОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ

После ликвидации полиомиелита в структуре нейроинфекций первое место занимает менингококковый менингит. Заболеваемость менингококковой инфекцией (МИ) по России в 2003 г. составила 10,7 на 100 тысяч детского населения. В Свердловской области за последние пять лет заболеваемость МИ увеличилась с 13 до 21 на 100 тысяч детского населения. Обращает на себя внимание увеличение числа генерализованных форм МИ и неблагоприятных исходов по сравнению преды-

дущими годами (с 6,3 % до 10,2 % за последние пять лет, по данным МУ «ДИБ» г. Екатеринбурга). Молниеносные формы инфекции дают почти абсолютный процент летальности [2, 3, 4].

Противоменингококковая резистентность инициируется следующими факторами – местный барьер слизистой носоглотки, система комплемента, специфический иммунитет и бактерицидная активность лейкоцитов. Известно, что в остром периоде у больных ГМИ отмечается Т-лимфопения, причем степень ее коррелирует с тяжестью заболевания. Различными авторами показан исход инфекции в зависимости от уровня содержания разных цитокинов (интерлейкинов 1, 6, 8, 10, фактора некроза опухоли, дефензинов) в плазме или ликворе. Нами оценена цитокинпродуцирующая способность Т-лимфоцитов периферической крови при генерализованной менингококковой инфекции у детей.

Цель работы – оценить функциональное состояние фагоцитарного звена иммунитета и Т-лимфоцитов при генерализованной менингококковой инфекции у детей.

Под наблюдением находилось 20 детей с генерализованной менингококковой инфекцией. Изолированный менингит диагностирован у 4 детей, менингококцемия – у 2 больных. Инфекционно-токсический шок (ИТШ) развился у 7 детей.

Всем детям проводились стандартные клинико-лабораторные и иммунологические исследования (лаборатория клинической иммунологии Центра лабораторной диагностики, гл. врач – д.м.н., проф. Я.Б. Бейкин). Содержание лейкоцитов, лимфоцитов, гранулоцитов определялось с помощью гематологического анализатора «Cobas Minos Stex» («АВХ»). Фенотипирование лимфоцитов осуществлялось методом прямой иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител производства ООО «Сорбент» (г. Москва). Регистрация результатов проводилась методом лазерной проточной цитометрии на цитофлюомере «FacsCan» («Becton Dickinson»). Для оценки внутриклеточного синтеза цитокинов мононуклеары периферической крови получали путем выделения на градиенте плотности фиколл-верографина (1,077 г/см³). Спонтанную продукцию ИЛ2, ИЛ4, ИФН- γ и ФНО- α Т-лимфоцитами оценивали по истечении 4 часов инкубации в присутствии брэфельдина А при 37 °С, в атмосфере 5 % CO₂. В качестве активатора для стимуляции

внутриклеточного синтеза использовали РМА («Sigma», 50 µg/ml) плюс иономицин («Sigma», 1 µg/ml). Иммунофенотипирование проводили с использованием ФИТЦ-меченых анти-CD3-моноклональных антител (ООО «Сорбент», г. Москва) РЕ-конъюгированных анти-ИЛ2, ИЛ4, ИФН-γ и ФНО-α-антител (Caltag) [1]. 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, 1981). Полученные данные обрабатывались с помощью программного пакета MS Office 98.

Результаты и их обсуждение

Клиническая картина заболевания не отличалась от ранее описанной в литературе [3,4]. Острое начало отмечено в 98 % случаев. При развитии менингококцемии типичная сыпь геморрагического характера появлялась в первые сутки заболевания у 70 % детей.

У детей со смешанной формой МИ, а также у детей с изолированным менингитом общемозговые симптомы наблюдались у 81 %, менингеальные знаки встречались у 92 % пациентов. У детей с клиникой ИТШ I–II степени наблюдалось острейшее начало болезни. У всех больных отмечались тахипноэ, тахикардия, нарушение сознания – у 67 %, множественная геморрагическая сыпь с тенденцией к слиянию – 60 %, гипотония – у 50 % и субкомпенсированный ацидоз – у 27 %.

Анализ гемограмм выявил следующее: лейкоцитоз ($p < 0,05$) отмечен у 85 % детей, нейтрофилез ($p < 0,05$) – у 89,6 % детей, моноцитоз – у 46 % детей, лимфопения – у 61 % детей, ускоренная СОЭ – у 100 % больных; в иммунограмме – увеличение числа фагоцитирующих моноцитов ($0,35 \pm 0,19 \times 10^9/\text{л}$, $p < 0,05$) и нейтрофилов ($10,30 \pm 1,46 \times 10^9/\text{л}$, $p < 0,05$), но при этом поглотительная способность (АФ) нейтрофилов и моноцитов периферической крови была снижена: АФ моноцитов – $71,50 \pm 3,62$ %, $p > 0,05$; АФ нейтрофилов – $84,39 \pm 2,78$ %, $p < 0,05$; повышение бактерицидной активности (БА) лейкоцитов ($38,17 \pm 3,03$ %), высокие показатели ЦИК ($75,60 \pm 7,80$ ед., $p < 0,05$), Т-лимфопения ($p < 0,05$), нормальные показатели НСТ-теста и уровня комплемента.

У больных с клиникой ИТШ наблюдались более высокие показатели лейкоцитоза ($p < 0,05$), число фагоцитирующих моноцитов и нейтрофилов было равно $0,31 \pm 0,06 \times 10^9/\text{л}$ и $12,33 \pm 2,97 \times 10^9/\text{л}$ соответственно; АФ моноцитов – $63,60 \pm 6,49 \%$, АФ нейтрофилов $80,15 \pm 4,37 \%$, БА – $39,28 \pm 7,85 \%$ и снижение уровня IgM – менее $0,8 \text{ г/л}$ ($p > 0,05$ по сравнению с детьми без клиники ИТШ). Несмотря на увеличение абсолютного числа нейтрофилов и моноцитов, участвующих в фагоцитозе, поглотительная способность этих клеток при ГМИ у детей была снижена.

Основными клетками-продуцентами цитокинов являются Т-хелперы и макрофаги. Известно, что Т-хелперы являются неоднородной клеточной популяцией, а также то, что разные типы Т-хелперов поддерживают различные ветви иммунитета. Т-хелперы 1 типа (Th1) продуцируют ИЛ-2 и ИФН- γ , тогда как Т-хелперы 2 типа (Th2) – ИЛ-4, –5, –10. Th1 осуществляют хелперную функцию в формировании клеточного иммунитета, а Th2 – гуморального. Тканевые макрофаги, нейтрофилы, естественные киллеры, активированные бактериальными антигенами, образующимися в процессе фагоцитоза возбудителя, продуцируют провоспалительные цитокины (ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО, ИЛ-8, ГМ-КСМ и др.).

Данные, характеризующие цитокинпродуцирующую активность Т-лимфоцитов периферической крови детей при генерализованной менингококковой инфекции, представлены в табл. 1.

Таблица 1

**Динамика содержания ИФН γ , ИЛ-2, ИЛ-4,
TNF α -продуцирующих Т-лимфоцитов при генерализованной
менингококковой инфекции у детей**

Показатель, $\times 10^9/\text{л}$	1-е исследование, n = 20		2-е исследование, n = 20	
	спонтанный	стимулированный	спонтанный	стимулированный
CD3 $^+$ /ИФН γ $^+$	$0,06 \pm 0,01^* \uparrow$	$0,37 \pm 0,07^* \downarrow$	$0,06 \pm 0,01^* \uparrow$	$0,53 \pm 0,06^{**}$
CD3 $^+$ /TNF α $^+$	$0,05 \pm 0,02 \uparrow$	$0,47 \pm 0,08^* \downarrow$	$0,08 \pm 0,01^* \uparrow$	$0,67 \pm 0,08^{**}$
CD3 $^+$ /Ил-2 $^+$	$0,06 \pm 0,01^* \uparrow$	$0,33 \pm 0,06^* \downarrow$	$0,13 \pm 0,05^* \uparrow$	$0,43 \pm 0,07$
CD3 $^+$ /Ил-4 $^+$	$0,06 \pm 0,01^* \uparrow$	$0,10 \pm 0,02^* \downarrow$	$0,08 \pm 0,03^* \uparrow$	$0,08 \pm 0,02 \uparrow$

* – достоверность различий с группой здоровых детей: $p < 0,05$.

** – достоверность различий между показателями в динамике: $p < 0,05$.

Как видно из табл. 1, при ГМИ увеличивается экспрессия ИЛ-2 в 2 раза, ИФН γ в 3 раза и TNF- α в 1,5 раза ($p < 0,05$) по сравнению со здоровыми детьми. Уровень стимулированной экспрессии цитокинов ИЛ-2, ИФН- γ и TNF- α был снижен в 1,4 раза ($p < 0,05$). Содержание CD3 $^{+}$ -клеток, продуцирующих ИЛ-4 было повышено в 3 раза ($p < 0,01$).

В динамике видно, что спонтанная экспрессия провоспалительных цитокинов осталась на том же уровне, а индуцированная экспрессия ИФН- γ и TNF- α увеличилась в 1,5 раза ($p < 0,05$) и была идентична показателям здоровых детей. Уровни спонтанной и стимулированной экспрессии цитокина ИЛ-4 были равны и превышали нормативные показатели в 2,5 раза ($p < 0,01$).

Данные, характеризующие цитокинпродуцирующую активность Т-лимфоцитов периферической крови детей при инфекционно-токсическом шоке, представлены в табл. 2.

Таблица 2

**Динамика содержания ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-4,
TNF- α -продуцирующих Т-лимфоцитов
при инфекционно-токсическом шоке у детей**

Показатель, x 10 ³ /л	Группа больных			
	больные с клиникой ИТШ, n = 7		больные без клиникой ИТШ, n = 14	
<i>Спонтанный</i>	1 исследование M \pm m	2 исследование M \pm m	1 исследование M \pm m	2 исследование M \pm m
CD3 $^{+}$ /ИФН γ [*]	0,05 \pm 0,02	0,12 \pm 0,04	0,06 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01
CD3 $^{+}$ /TNF α [*]	0,06 \pm 0,02	0,09 \pm 0,02* [†]	0,04 \pm 0,02	0,04 \pm 0,01
CD3 $^{+}$ /ИЛ-2 [*]	0,11 \pm 0,04	0,20 \pm 0,16	0,04 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01
CD3 $^{+}$ /ИЛ-4 [*]	0,09 \pm 0,03	0,19 \pm 0,10	0,05 \pm 0,02	0,04 \pm 0,01
<i>Стимулированный</i>				
CD3 $^{+}$ /ИФН γ [*]	0,23 \pm 0,08	0,55 \pm 0,15	0,33 \pm 0,08	0,45 \pm 0,07
CD3 $^{+}$ /TNF α [*]	0,47 \pm 0,19	0,69 \pm 0,20	0,44 \pm 0,10	0,56 \pm 0,08
CD3 $^{+}$ /ИЛ-2 [*]	0,39 \pm 0,15	0,37 \pm 0,09	0,28 \pm 0,07	0,37 \pm 0,09
CD3 $^{+}$ /ИЛ-4 [*]	0,10 \pm 0,03	0,11 \pm 0,04	0,09 \pm 0,02	0,05 \pm 0,02

* – достоверность различий между показателями в динамике: $p < 0,05$.

Как видно, стартовые показатели спонтанной экспрессии Т-лимфоцитами ИЛ-2, ИЛ-4, TNF-а в группе детей с клиникой ИТШ были выше по сравнению со второй группой. В динамике у детей первой группы нарастает спонтанная экспрессия не только провоспалительных цитокинов, но и интерлейкина-4, в отличие от больных без клиники ИТШ. Возможно, это связано с дополнительной антигенной стимуляцией, возникающей при шоковых состояниях. Стимулированная экспрессия ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-4, TNF-а в обеих группах существенно не различалась.

Для оценки субпопуляций активированных Т-лимфоцитов нами предложен индекс, который представляет собой соотношение Т-лимфоцитов, экспрессирующих ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-4, TNF- α . Расчет производился по формуле:

$$\text{индекс} = \frac{(CD3+ / INF\gamma) - (CD3+ / ИЛ4)}{CD3+ / ИЛ4}.$$

У здоровых детей индекс при спонтанном синтезе равен 0,38, при стимулированном – 12,41. В остром периоде генерализованной менингококковой инфекции у детей без клиники шока индекс спонтанного синтеза равнялся 0,2, стимулированного – 2,67. При наличии симптомов инфекционно-токсического шока индекс приобретает отрицательные значения: –0,44, при стимулированном синтезе равен 1,3. В период санации ликвора соотношение Th1/Th2 при спонтанном синтезе у детей без клиники ИТШ составило 0,25, при стимулированном – 8,00, а у детей с наличием ИТШ – (–0,36) и 4,00 соответственно. Неоднородность значений коэффициента у больных с клиникой шока и без него, возможно, указывает на более глубокий дисбаланс между про- и противовоспалительными факторами иммунной системы. Несмотря на снижение общего числа Т-лимфоцитов при ГМИ, количество ИФН- γ , TNF- α , ИЛ-4, ИЛ-2, продуцирующих CD 3⁺ Т-лимфоцитов выше нормативных показателей в 2,5 раза.

Таким образом, полученные нами данные позволяют предположить, что при генерализованной менингококковой инфекции в остром периоде болезни под влиянием эндотоксина происходит нарастание спонтанной экспрессии про-

воспалительных цитокинов (ИФН- γ , TNF- α , ИЛ-2) в 1,5–2 раза, что приводит к увеличению числа эффекторных популяций гранулоцитов и моноцитов. Стимулированная экспрессия CD3 клетками ИФН- γ , TNF- α , ИЛ-2 была значительно ниже – возможно, это указывает на угнетение функции Th первого порядка и цитотоксических лимфоцитов. Увеличение количества T-клеток, экспрессирующих ИЛ-4, возможно, является компенсаторной реакцией в этой ситуации.

Угнетение поглотительной способности фагоцитов периферической крови при ГМИ у детей носит транзиторный характер. Возможно, это ограничивает высвобождение эндотоксина, уменьшая тем самым антигенную нагрузку.

Системный иммунный ответ при менингококковой инфекции характеризуется дисбалансом провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в результате непосредственного воздействия эндотоксина. В итоге нарушаются процессы презентации антигена и взаимодействия иммунокомпетентных клеток, развивается диснергия T-лимфоцитов (не только уменьшается число CD3-клеток, но и снижается их функция). Активация Th2-звена иммунитета приводит к нарастанию уровня IgM, что обуславливает благоприятное течение болезни.

Список литературы

1. Бейкин Я.Б. Характеристика иммунного статуса здоровых детей дошкольного возраста / Лагерева Ю.Г., Богданова Л.В., Ищенко Н.В. // Адаптационно-компенсаторные иммунологические реакции в норме и патологии у детей: Сб. науч. статей / Под ред. В.В. Фомина, А.И. Ольховикова, С.А. Царьковой, О.А. Чеснаковой. – Екатеринбург: Изд-во УГМА, 2003. – С. 25–30.
2. Демина А.А. Эпидемиологический надзор за менингококковой инфекцией и гнойными бактериальными менингитами // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 1998. – № 2. – С. 25–28.
3. Коршунов М.Ф. Менингококковая инфекция у детей. – Воронеж: Изд-во ВГУ, 1991. – 184 с.
4. Покровский В.И. Менингококковая инфекция / Фаворова Л.А., Костюкова Н.Н. – М.: Медицина, 1976. – 275 с.
5. Фомин В.В., Козлова С.Н., Князев Ю.А. Гипоталамо-гипофизарная система и иммунный ответ при инфекционных заболеваниях у детей. – Свердловск, 1991. – 240 с.