

На правах рукописи

БАЦКАЛЕВИЧ НАТАЛИЯ АЛЕКСАНДРОВНА

**КЛИНИЧЕСКИЕ, ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
И ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ
ВРОЖДЕННОГО И АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА У
ПОДРОСТКОВ С ЭНТЕРОВИРУСНЫМ МЕНИНГИТОМ**

14.00.09 – Педиатрия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Екатеринбург - 2009

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Уральская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» на базе Муниципального учреждения «Городская клиническая больница №40», Муниципального учреждения «Клинико-диагностический центр» г. Екатеринбург

Научный руководитель:

Заслуженный деятель науки РФ,
доктор медицинских наук, профессор

Фомин Виталий Васильевич

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор
кандидат медицинских наук

Зеленцова Вера Леонидовна
Савинова Татьяна Леонидовна

Ведущее учреждение:

Защита состоится «13» ноября 2009 г. в 12:00 часов на заседании совета по защите докторских диссертаций Д208.102.02, созданного при Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Уральская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию», по адресу: 620028, г. Екатеринбург, ул. Репина, д.3

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГОУ ВПО УГМА Росздрава по адресу: 620028, г. Екатеринбург, ул. Ключевская, д. 17, а с авторефератом - на сайте академии www.usma.ru.

Автореферат разослан «11» октября 2009 г.

Ученый секретарь совета по защите
докторских и кандидатских диссертаций
доктор медицинских наук, профессор

Гришина И.Ф.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Энтеновирусная инфекция относится к тем заболеваниям, с которыми врач чаще сталкивается, чем ставит этот диагноз, что связано с повсеместным распространением, пантропизмом энтеровирусов и, следовательно, манифестацией данной инфекции в виде различных клинических вариантов с возможным поражением одного или нескольких органов и систем (Козлова С.Н., 1988, Ковтун О.П., 1997; Ворошилова М.К., 1979; Кожарская Г.В., 1998; Беляков В.Д., 2001; Демина А.В., 2003; Лашкевич В.А., 2004; Михайлов Е.В., 2008; Но М., 1999).

На протяжении последних 40 лет зарегистрированы вспышки энтеровирусной инфекции в США, Австралии, Японии, Швеции, Болгарии, Канаде, Бразилии, Венгрии, КНР и многих других странах (Лашкевич В.А., 2004; МУ 3.1.1.2130-06). С улучшением диагностических тестов стало известно, что от 80 до 92% всех асептических менингитов вызываются энтеровирусами (Лобзин Ю.В., 2001; Михайлов Е.В., 2008).

С одной стороны, как антигенный раздражитель, энтеровирус стимулирует развитие иммунной реактивности, с другой стороны, как внутриклеточный паразит, подавляет функциональную активность иммунокомпетентных клеток и превращает их в мишень для действия цитотоксических клеток (Фомин В.В., 1991; Букринская А.Г., 1991; Игнатов П.Е., 2002).

Нейрогормональные механизмы, осуществляющие общую настройку любого звена иммунной системы, определяют параметры адаптации организма к внешним воздействиям. Асинхронность между иммунной и эндокринной системами у подростков является результатом перехода взаимодействия между ними на качественно новый уровень (Фарбер Д.А., 1988; Козловский В.Н., 1989; Терещенко Е.В., 1991; Коколина В.Ф., 1998; Гуркин Ю.А., 2001; Левина Л.И., 2008).

Подростковый возраст, по напряженности процессов, протекающих в организме, занимает в онтогенезе второе место после периода новорожденности.

Неадекватное функционирование системы иммунитета у подростков является основой возрастной устойчивости и подверженности организма к заболеваниям вирусной, бактериальной, паразитарной природы, а также различным иммунопатологическим реакциям (Сердюковская Г.Н., 1979; Терещенко Е.В., 1991; Сорокин О.В., 2007; Чередниченко А.М., 2008; Левина Л.И., 2008).

Изменение реактивности физиологических систем подростка к внешним воздействиям приводит к снижению функциональных и адаптационных возможностей организма. Это определяет необходимость прогнозировать состояние иммунной реактивности подростка при различных инфекционных заболеваниях, выбора оптимальных условий наблюдения и адекватной терапии, что и послужило основанием для выполнения настоящей работы.

Цель работы. Выявить клинические и иммунологические особенности энтеровирусного менингита у пациентов подросткового возраста и уточнить влияние стартовых показателей врожденного (натуральные киллеры) и адаптивного иммунитета (цитотоксические лимфоциты) на сроки санации ликвора.

Задачи исследования:

1. Представить клиническую характеристику энтеровирусного менингита у подростков.
2. Сравнить клинику острого периода заболевания и стартовые показатели иммунитета у подростков, детей и взрослых больных энтеровирусным менингитом.
3. Установить численность и особенности функционального состояния субпопуляций CD3⁺-лимфоцитов, содержащих эндоплазматические цитокины (ИЛ2, ИЛ4, ИФН γ и ФНО α).
4. Оценить клиническое значение стартового уровня CD3⁺- клеток при энтеровирусном менингите у подростков.

5. Оценить влияние стартовых иммунологических показателей на сроки санации ликвора.

Научная новизна исследования. В отличие от ранее проведенных исследований (Козлова С.Н., 1988, Ковтун О.П., 1997, Кожарская Г.В., 1998, Хаманова Ю.Б., 2006) нами выявлены клинические и иммунологические особенности энтеровирусного менингита у пациентов подросткового возраста.

Установлено, что в острую стадию заболевания иммунологическое равновесие при энтеровирусном менингите у подростков осуществляется кооперацией фагоцитарного и клеточного звеньев иммунитета, что отражено в связях между уровнем, уровнем NK-клеток и фагоцитарной активностью моноцитов, между уровнем моноцитов и цитотоксических лимфоцитов.

Выявлена зависимость клинических симптомов острого периода от уровня субпопуляций $CD3^+$ -лимфоцитов, содержащих цитоплазматические цитокины (ФНО α , ИЛ2, ИФН γ), которые контактным путем воздействовали на эндотелиальные клетки. Установлено, что повышение уровня лимфоцитов, содержащих $TNF\alpha^+$ и $ИЛ2^+$ в острую стадию болезни, связано с симптомами интоксикации, выраженностью головной боли, длительностью выявления менингеальных симптомов, уровнем цитоза ликвора, в острый период и период реконвалесценции.

Учитывая, что при энтеровирусном менингите, в периоде реконвалесценции, одним из критериев выздоровления является нормализация показателя цитоза ликвора, проведена оценка зависимости времени санации ликвора от стартового уровня клеток врожденного и адаптивного иммунитета.

Практическая значимость работы. Результаты проведенного исследования позволили: 1) уточнить клинические и иммунологические особенности энтеровирусного менингита у пациентов подросткового возраста; 2) дали возможность прогнозировать сроки выздоровления и санации ликвора, что помо-

жет оптимизировать время проведения контрольного обследования и выписки из стационара; 3) определить показания к проведению иммунологического обследования при энтеровирусном менингите у подростков.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Клиническая картина энтеровирусного менингита у пациентов подросткового возраста отличается от течения заболевания у детей и взрослых больных. Для подростков, как и для детей, характерно острое начало заболевания с симптомов инфекционного токсикоза, температурной реакции. Длительность выявления общемозговых и менингеальных симптомов у подростков соответствует течению заболевания у взрослых больных.
2. Иммунологической закономерностью при энтеровирусном менингите у подростков является снижение уровня субпопуляций лимфоцитов за счет натуральных киллеров и цитотоксических лимфоцитов и снижение функциональной активности CD3⁺- лимфоцитов, содержащих провоспалительные цитоплазматические цитокины (IFN γ , TNF α , IL2).
3. При менингеальной форме энтеровирусной инфекции у подростков - подростков наблюдается медленная санация ликвора при низких стартовых показателях натуральных киллеров и цитотоксических лимфоцитов.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на проблемной комиссии по специальности «Педиатрия» в ГОУ ВПО УГМА Росздрава 10.06.2009, представлены на XIV конгрессе по реабилитации в медицине и иммунореабилитации. По теме диссертации опубликовано 5 работ.

Внедрение в практику. Результаты исследования внедрены в работу инфекционного отделения воздушно-капельных инфекций МУ «ГКБ №40» г. Екатеринбурга. Результаты исследования включены в учебно-методическое пособие для врачей «Детские инфекционные болезни у подростков» (Екатеринбург, 2005; присвоен гриф УМО 09.03. 2006), используются в учебном процессе на кафедре инфекционных заболеваний у детей УГМА.

Объём и структура работы. Диссертация изложена на 131 странице и состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 178 источников, в том числе 98 отечественных и 80 иностранных авторов. Работа иллюстрирована 26 таблицами, 46 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. В работе представлены материалы и результаты открытого проспективного исследования, проведенного в г. Екатеринбурге в 2006-2008 гг., больных, находившихся на лечении в отделениях клиники инфекционных болезней Уральской государственной медицинской академии на базе МУ «ГКБ № 40» (главный врач А.И.Степанов).

В исследование включены 36 пациентов с диагнозом энтеровирусная инфекция, менингеальная форма, средней степени тяжести в возрасте от 15 до 18 лет, отобранные случайным методом из смещенной выборки. Учитывая возрастные особенности гемо- иммунограммы, сравнительный анализ основных гематологических и иммунологических показателей проведен в трех группах больных, разделенных по возрастным критериям. В первую – основную группу вошли подростки от 15 лет до 18 лет 11 месяцев, вторую – группу сравнения составили дети от 7 лет до 13 лет 11 месяцев, в третью – группу сравнения вошли пациенты с 19 лет. Анализ данных проводился в динамике: на первой и третьей неделе заболевания (острый период и период реконвалесценции)

(рис.1).

Критерием постановки диагноза явились: характерный клинический симптомокомплекс, типичные изменения в анализе ликвора. Для этиологической верификации диагноза энтеровирусной инфекции использовано обнаружение РНК вируса в ликворе методом полимеразной цепной реакции.

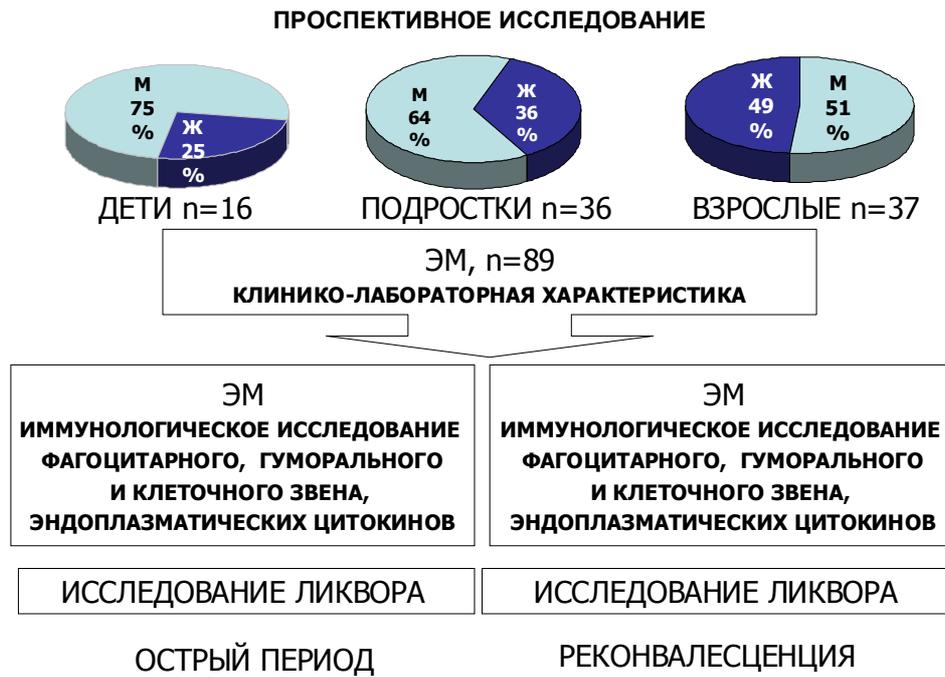


Рисунок 1. Дизайн исследования

Для исключения микст-клещевой инфекции проводилось исследование крови с использованием иммуноферментных тест систем для определения IgM и IgG антител к *Borrelia burgdorferi* и вирусу клещевого энцефалита. Из исследования исключены пациенты с положительным или сомнительным результатом ИФА на клещевой энцефалит и болезнь Лайма (n=15), с хроническими заболеваниями органов желудочно-кишечного тракта и почек (n=21), больные с повышением aminotransferases более 1,5 нормы (n=18). У всех 89 больных проводились следующие исследования: общий анализ крови, клинический анализ ликвора, исследование иммунного статуса. Выделение РНК из ликвора проводилось путем получения кДНК на матрице РНК, ПЦР-амплификация кДНК эн-

теровирусов (*Enterovirus*) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

С помощью коммерческих тест-систем («NOVATEC Immunodiagnostica», Германия) осуществлялось определение IgM и IgG антител к *Borrelia burgdorferi* и вирусу клещевого энцефалита.

Параметры общего анализа крови определялись с помощью гематологического анализатора Cobas Minos Stex («ABX»). Исследование проводилось в динамике острого периода на 1-7 и 15-21 день заболевания.

Иммунологические исследования проводились на базе МУ «Клинико-диагностического центра» Управления здравоохранения Администрации г. Екатеринбурга (главный врач, д.м.н., профессор Я. Б. Бейкин).

Иммунофенотипирование лимфоцитов осуществляли с использованием моноклональных антител CD3-FITC/CD20-PE, CD3-FITC/CD4-PE, CD3-FITC/CD8-PE, CD3-FITC/CD16+56-PE («IO Test») методом проточной цитофлуориметрии на цитометре FACScan («Becton Dickinson»). Количество иммуноглобулинов классов M, G, A в сыворотке крови определяли методом радиальной иммунодиффузии в агаровом геле, предложенным G. Mancini (1965). Содержание циркулирующих иммунных комплексов определяли методом преципитации их в 4 % растворе ПЭГ-6000 по V. Naskova в модификации Ю. А. Гриневич (1981). Результаты оценивали в единицах экстинции с помощью спектрофотометрии на аппарате СФ-46. Функционирование НАДФ-оксидазной системы нейтрофилов оценивали при помощи спонтанного НСТ-теста (Демин, 1981).

Для оценки внутриклеточного синтеза цитокинов мононуклеары периферической крови получали путем выделения на градиенте плотности фиколлуверографина ($1,077 \text{ г/см}^3$). Спонтанную продукцию ИЛ2, ИЛ4, ИФН γ и ФНО α Т-лимфоцитами оценивали по истечении 4 часов инкубации в присутствии брефельдина А при 37 °С, в атмосфере 5 % CO $_2$. В качестве активатора для стимуляции внутриклеточного синтеза использовали РМА («Sigma», 50 ng/ml)

плюс иономицин («Sigma», 1 µg/ml). Иммунофенотипирование проводили с использованием ФИТЦ-меченых анти-CD3-моноклональных антител (ООО «Сорбент», г. Москва) реконъюгированных анти-ИЛ2-, ИЛ4-, ИФНγ- и ФНОα-антител (Caltag).

Для оценки внутриклеточного киллинга (бактерицидной активности (БА) лейкоцитов, завершенности фагоцитоза) использовался метод, разработанный в лаборатории клинической иммунологии Института иммунологии МЗ РФ [89]. Лейкоциты выделяли в 3% растворе желатина в фосфатно-солевом буфере (ФСБ). В опытную лунку вносили 90 мкл живых ФИТЦ-меченых бактерий (*St. aureus* Cowan 1), 20 мкл аутосыворотки и 90 мкл лейкоцитов в концентрации 2 млн. в 1 мл. Смесь инкубировали 20 мин при 37°C, лейкоциты осаждали в течение 1 мин при 200g, 2 раза отмывали ФСБ от несвязавшихся бактерий, ресуспендировали в 200 мкл ФСБ и инкубировали 1 час при 37°C. После остановки киллинга лейкоциты разрушали в течение 10 мин и ресуспендировали в 200 мкл ФСБ с 2,5 мкг пропидиум иодида («Sigma»), окрашивающего только убитые клетки. Через 30 – 40 мин пробы анализировали на проточном цитометре «FACSCan» (Becton Dickinson).

Для оценки поглотительной активности (АФ) нейтрофилов и моноцитов использовался метод, разработанный в лаборатории клинической иммунологии Института иммунологии МЗ РФ. Лейкоциты выделяли в 3 % растворе желатина в фосфатно-солевом буфере (ФСБ). В опытную лунку вносили 90 мкл живых ФИТЦ-меченых бактерий (*St. aureus* Cowan 1), 20 мкл аутосыворотки и 90 мкл лейкоцитов в концентрации 2 млн. в 1 мл. После 30-минутной инкубации при 37°C лейкоциты осаждали в течение 1 мин при 200g, 2 раза отмывали ФСБ от несвязавшихся бактерий, ресуспендировали в 200 мкл ФСБ и вносили 5 мкл анти-CD 14 (PE) моноклональных антител («Caltag») для оценки мембранной экспрессии CD 14 рецептора на моноцитах. Инкубировали 15 мин при комнатной температуре, затем вносили 200 мкл лизирующего раствора FacsLysing (Becton Dickinson), через 5 – 12 мин однократно отмывали 200 мкл

ФСБ и ресуспендировали в 200 мкл раствора ФСБ. Анализ проб проводился на проточном цитометре «FACSCan» (Becton Dickinson). Оценивали процент клеток среди нейтрофилов и моноцитов, положительных по зеленой флюоресценции (поглотивших ФИТЦ-меченые бактерии).

Анализ преимущественной направленности иммунного ответа по Th1 или Th2 типа проведен с использованием индекса поляризации (ИП), который рассчитывался по формуле (Богданова Л.В., Лагерева Ю.Г., 2003):

$$\text{ИП} = \frac{\text{CD3}^+/\text{IFN}\gamma^+ - \text{CD3}^+/\text{IL4}^+}{\text{CD3}^+/\text{IL4}^+}$$

Положительные значения ИП свидетельствовали о преобладании клеточно-опосредованных механизмов в иммунном ответе, отрицательные значения указывали на ведущую роль гуморального звена.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием пакета прикладных программ «Microsoft Office» и STATISTICA 6,0 фирмы StatSoft Inc. (США) для персонального компьютера на базе процессора Intel Celeron 1200.

Описание количественных данных в зависимости от вида их распределения выполнялось с использованием модуля «Basic statistics / Tables». Производился расчет следующих параметров: число наблюдений, среднее значение, стандартное отклонение, стандартная ошибка среднего, минимум и максимум, размах. Результаты статистических расчетов представлялись в таблицах и графиках – диаграммах размахов и диапазонов.

Сравнение двух независимых групп выполнялось с использованием параметрического метода проверки статистических гипотез – t-критерия Стьюдента для независимых выборок и непараметрических методов проверки статистических гипотез – критерии Манна-Уитни, Вальда-Вольфовица.

В сравнении двух зависимых групп применялся параметрический метод – t-критерий для зависимых выборок и непараметрический метод – вычисление критерия Вилкоксона.

Для описания распределения качественных признаков использовался модуль «Nonparametrics / Distrib.» и подмодуль «Ordinal descriptive statistics». Вычисление абсолютных частот и процентов для одного качественного признака выполнялось путём построения таблиц частот и процентов в модуле «Basic statistics / Tables» и помодуле «Frequency tables».

Сравнение групп по качественному признаку реализовалось с помощью построения таблиц сопряженности и дальнейшим анализом на предмет проверки гипотезы о случайности распределения частот с использованием методов – χ^2 по Пирсону, χ^2 с поправкой Йетса, точный критерий Фишера.

Критический уровень статистической значимости (p) принимался равным 0,05. Единицы измерений приведены в системе СИ.

Результаты исследования и их обсуждение. Для решения поставленных задач нами было обследовано 89 больных с энтеровирусным менингитом, средней степени тяжести.

Основную группу составили 36 пациентов подросткового возраста с 15 до 18 лет. По данным ВОЗ подростковый возраст включает период с 10 до 20 лет. Выделение в основную группу подростков с 15 до 19 лет связано с наибольшей уязвимостью данной возрастной категории в плане нейрогуморальной перестройки организма и в связи направлением их на лечение и динамическое наблюдение из педиатрической в общетерапевтическую сеть.

Проведено сравнение клинических и иммунологических показателей у больных подросткового возраста со взрослыми больными с 19 до 40 лет и 16 детьми в возрасте от 6 до 14 лет.

Диагноз энтеровирусного менингита был поставлен на основании клинических симптомов, анализа клеточного состава ликвора, данных эпидемиологического анамнеза, в 95% подтвержден обнаружением РНК вируса в ликворе методом ПЦР.

У всех больных основной и групп сравнения с энтеровирусным менингитом средней тяжести отмечалась классическая клиническая картина болезни.

Для пациентов подростковой группы в 88% было характерно острое начало заболевания с лихорадки, симптомов инфекционного токсикоза.

В 12% случаев начало заболевания постепенное с явлений умеренно выраженной интоксикации в виде слабости, недомогания, субфебрильной температуры в течение 3-4 дней.

В 55,6% случаев у подростков с первого дня заболевания определялись симптомы, косвенно указывающие на наличие менингита: головная боль, боль при движении глазных яблок, тошнота и рвота, у 44,4% преобладали общеинфекционные симптомы: слабость, недомогание, боль и першение в горле.

Повышение температуры с первого дня заболевания регистрировалось у 86,1% подростков, головная боль с первого дня заболевания отмечалась у 72,2%, тошнота и рвота у 44,5%, катаральные симптомы отмечали 36,1% больных подростков в первый день заболевания.

При исследовании клинической картины энтеровирусного менингита у пациентов групп сравнения получены следующие данные: у детей острое начало заболевания регистрировалось в 93,7%, катаральные симптомы в 50% случаев, повышение температуры с первого дня заболевания у 93,7%, головная боль у 87,5% тошнота и рвота у 44,5% больных .

У взрослых пациентов: острое начало зафиксировано только в 70% случаев, катаральные симптомы отмечали 19% больных, повышение температуры в первый день – 67,5%, тошнота и рвота – 21,6%.

Проведенный анализ показал, что по характеру клинической картины начального периода, выраженности общеинфекционных симптомов пациенты подростковой группы отличаются от больных групп сравнения – взрослых и детей ($p < 0,05$).

Частота наблюдения основных клинических симптомов в первый день заболевания представлена на рисунке 2.

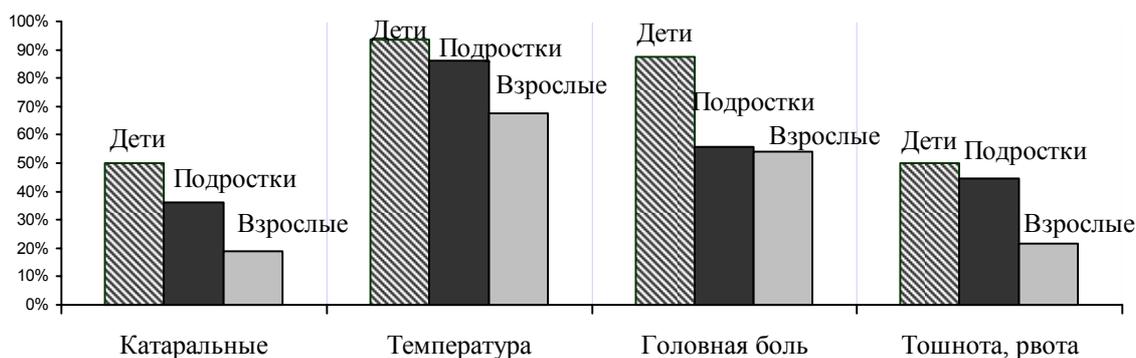


Рис 2. Частота наблюдения основных клинических симптомов энтеровирусного менингита в начальный период у пациентов различных возрастных групп.

При сравнительной клинической характеристике энтеровирусного менингита у пациентов различных возрастных групп нами установлена средняя продолжительность клинических симптомов у пациентов подросткового возраста при энтеровирусном менингите, проведено сравнение длительности наблюдения симптомов в различных возрастных группах (рис.3).

У подростков длительность лихорадки составила $4,1 \pm 0,4$ и не превышала 9 дней, продолжительность церебралгии - $5,4 \pm 0,4$ дня и сохранялась максимально до 9 дня болезни, тошнота и рвота - $2,03 \pm 0,3$, максимально до 6 дня соответственно. Менингеальные симптомы у подростков регистрировались: ригидность до $6,7 \pm 0,7$, симптом Брудзинского до $6,2 \pm 0,8$, симптом Кернига до $7,9 \pm 0,7$ дня болезни. Максимальная длительность наблюдения менингеальных симптомов составила 16 дней.

Очаговая неврологическая симптоматика отсутствовала у всех пациентов.

По длительности наблюдения симптомов заболевания у подростков и детей обнаружены следующие различия: увеличение длительности лихорадочного периода ($p < 0,05$), увеличение длительности регистрации головной боли ($p < 0,05$), увеличение продолжительности тошноты и рвоты ($p < 0,05$), увеличение периода выявления ригидности затылочных мышц и симптома Кернига ($p < 0,05$).

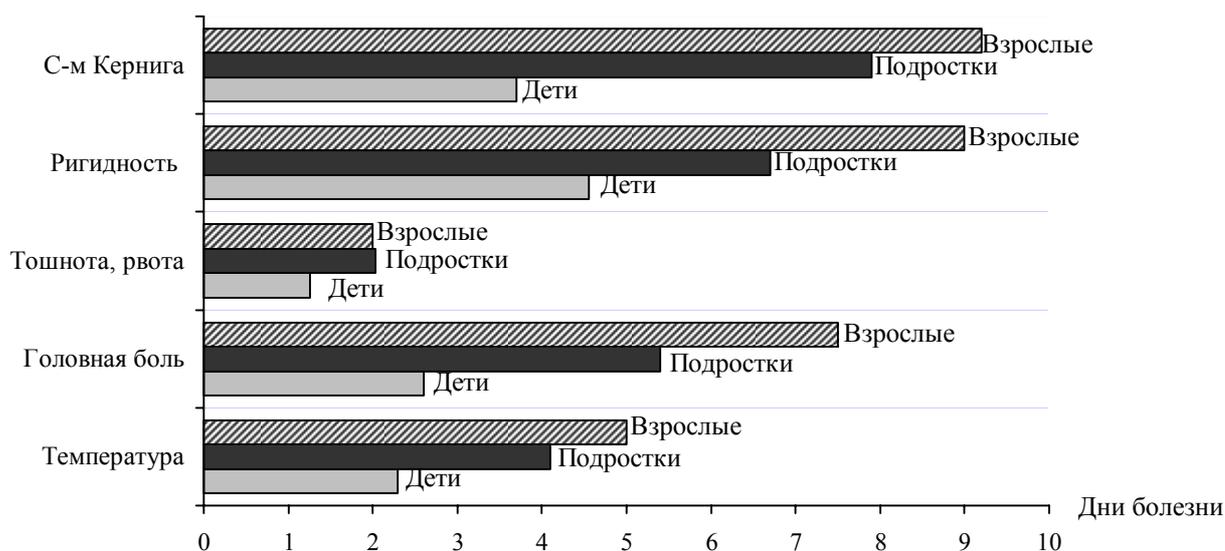


Рис. 3. Средняя длительность симптомов энтеровирусного менингита у пациентов различных возрастных групп (дни).

В группе подростков не выявлено статистического различия в длительности выявления симптомов энтеровирусного менингита у девушек и юношей ($p > 0,05$), (таб.1).

Таблица 1

Длительность наблюдения симптомов ЭМ у подростков

в зависимости от пола

Симптомы (дни)	Подростки n=36 (M±m)	
	Девушки n=13	Юноши n=23
Температура	3,5±0,5	4,2±0,5
Головная боль	5,8±0,8	5,0±0,5
Тошнота и рвота	1,7±0,4	2,2±0,4
Менингеальные симптомы	7,4±1,3	8,0±0,8

Примечание: - при сопоставлении показателей между группами $p > 0,05$

В острый период заболевания у подростков с энтеровирусным менингитом наблюдался преимущественно лимфоцитарный плеоцитоз ликвора. Сред-

ний показатель цитоза составил $141,6 \pm 26,1 \times 10^6/\text{л}$, максимальный показатель - $581 \times 10^6/\text{л}$.

В 86% случаев на третьей неделе заболевания не наблюдалось полной санации ликвора (цитоз $> 10 \times 10^6/\text{л}$). У 52% подростков, 25% детей и 40% взрослых пациентов цитоз ликвора на 18-20 день превышал $20 \times 10^6/\text{л}$.

У подростков - юношей цитоз ликвора на третьей неделе заболевания составил $22,8 \pm 5,3 \times 10^6/\text{л}$, у девушек - $24,0 \pm 7,1 \times 10^6/\text{л}$ соответственно, различий в уровне цитоза ликвора у подростков различного пола в период реконвалесценции не выявлено ($p > 0,05$).

Развитие воспалительного процесса при энтеровирусном менингите у подростков характеризовалось изменениями в неспецифическом и клеточном звене: лейкопения ($p < 0,05$), лимфопения ($p < 0,0001$), снижение уровня НК-клеток ($p < 0,0001$) и уровня цитотоксических лейкоцитов ($p < 0,01$) (рис.4).

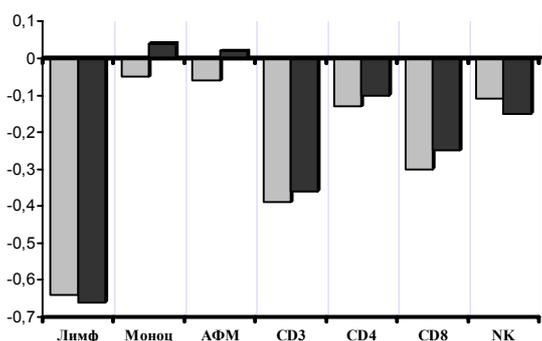


Рис.4 Динамика уровня показателей неспецифического и клеточного звена у подростков с ЭМ (по отношению к возрастной норме)

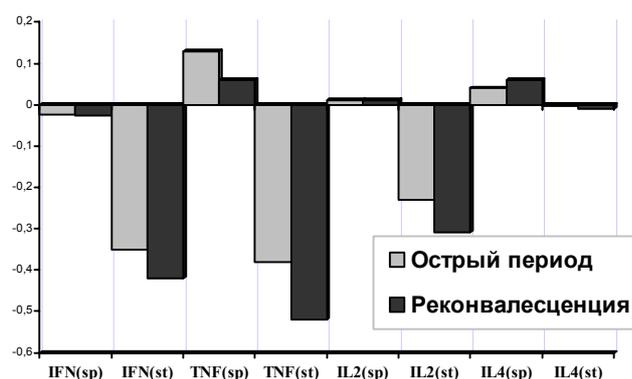


Рис.5 Уровень CD3-продуцирующих клеток при спонтанном и стимулированном определении у подростков с ЭМ (по отношению к возрастной норме)

Установлено, что первичные защитные реакции в острую стадию при энтеровирусном менингите у подростков, осуществляются через кооперацию фагоцитарного звена иммунитета и клеточно-опосредованных механизмов, что отражено в связях между уровнем НК-клеток и функционально активных моноцитов ($r=0,64$; $p < 0,05$), числом моноцитов и уровнем цитотоксических лимфоцитов ($r=0,63$; $p < 0,05$).

У детей и взрослых пациентов, так же выявлена адаптивно-компенсаторная содружественная реакция между цитотоксическими лимфоцитами и активностью моноцитарного фагоцитоза ($r=0,79$; $p<0,05$), что прогностически характеризует благоприятное течение заболевания.

Нами было установлено, что в начальном периоде болезни, при лихорадке, интоксикации, головной боли у подростков отмечается увеличение уровня лимфоцитов, содержащих $TNF\alpha^+$ ($p<0,01$), что подтверждает зависимость основных клинических симптомов от уровня $CD3^+$ -клеток. Действие этих клеток осуществляется при непосредственном контакте с эндотелиальными и другими клетками (рис.5).

Зависимость клинических симптомов от уровня $CD3$ -клеток, содержащих в цитоплазме провоспалительные цитокины подтверждена положительной корреляционной связью между длительностью и интенсивностью головной боли и числом $CD3^+/TNF\alpha^+$ ($r=0,61$; $p<0,05$), $CD3^+/IL2^+$ ($r=0,56$; $p<0,05$) - клеток, между уровнем плеоцитоза ликвора, в частности лимфоцитов ликвора, и $CD3^+/IL2^+$ лимфоцитами ($r=0,62$; $p<0,05$). Выявлена обратная связь между стартовым уровнем $CD3^+/TNF\alpha^+$ - лимфоцитов и уровнем плеоцитоза ликвора ($r=-0,6$; $p<0,05$) на третьей неделе болезни, между длительностью выявления менингеальных симптомов и числом $CD3^+/IFN\gamma^+$ - клеток ($r=-0,65$; $p<0,05$), что подтверждает действие этих клеток при непосредственном контакте с эндотелиальными и другими клетками.

Состояние иммунной реактивности зависит от сбалансированности цитокиновой регуляции, так как цитокины осуществляют взаимосвязь между неспецифическими защитными реакциями и клеточным иммунитетом. Регуляторные функции цитокинов в острый период заболевания отражены в связях между $CD3^+/IL2^+$ лимфоцитами и поглотительной активностью макрофагов ($r=0,65$; $p<0,05$), количеством $CD3^+/IL4^+$ - клеток и ЦИК ($r=0,62$; $p<0,05$).

Показателем функциональной активности $CD3^+$ лимфоцитов является их способность к синтезу эндоплазматических цитокинов. Общей закономер-

стью иммунологической перестройки субпопуляций CD3-клеток, содержащих провоспалительные цитокины IL2, TNF α , IFN γ , явилась их низкая функциональная активность и резервная возможность (рис.5), что может быть связано с супрессией или с синдромом затрат клеток при осуществлении иммунных реакций. Прямая зависимость между резервной возможностью CD3⁺/TNF α ⁺ - и CD3⁺/IFN γ ⁺- лимфоцитов и уровнем цитотоксических лимфоцитов прослеживается в начальный период болезни при активации клеточно-опосредованных механизмов иммунного ответа ($r=0,66$; $p<0,05$).

В гуморальном звене иммунитета, у пациентов всех групп сравнения, регистрировалось повышение уровня IgM ($p<0,0001$) в острый период и период ранней реконвалесценции, свидетельствующее о первичном характере иммунного ответа. Кооперация гуморального и фагоцитарного звена иммунитета в начальную стадию заболевания отражена в синергической реакции между функционально активными моноцитами и уровнем В-лимфоцитов ($r=0,42$; $p<0,05$).

При сравнении показателей иммунограммы у подростков в зависимости от пола (рис.6), не выявлено статистической разницы между уровнем показателей у юношей и девушек ($p>0,05$).

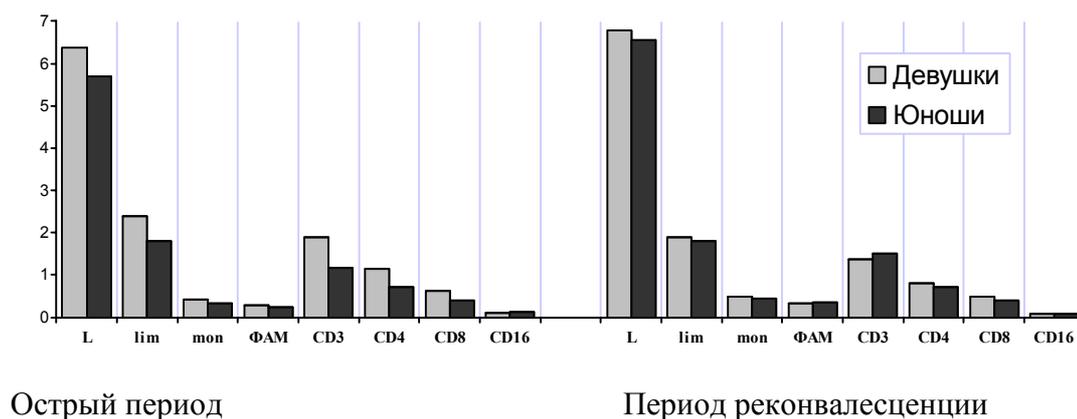


Рисунок 6. Уровень показателей неспецифического и клеточного звена иммунитета у подростков энтеровирусным менингитом на I, III неделе заболевания в зависимости от пола (10⁹/л)

Таблица 3

Иммуногематологические показатели у подростков, детей и взрослых при энтеровирусном менингите (M±m)

Показатель ×10 ⁹ /л	Подростки n=36		Дети n=16		Взрослые n=37	
	I неделя	III неделя	I неделя	III неделя	I неделя	III неделя
Лейкоциты	5,9±0,24 ↓*	6,53±0,24	7,0±0,6	7,8±0,7↑	5,8±0,4	5,66±0,45
Лимфоциты	1,96±0,1 ↓*	1,94±0,1 ↓	2,2±0,13	2,4±0,3	1,7±0,16 ↓*	1,9±0,11 ↓
Гранулоциты	3,57±0,2	4,1±0,29 ↑	4,2±0,53	4,8±0,6↑	3,7±0,38	3,38±0,38
Моноциты	0,36±0,02	0,45±0,05	0,59±0,04↑*	0,58±0,04↑	0,36±0,03	0,37±0,04 ↑
АФ нейтрофилов	3,05±0,22	3,5±0,25	3,86±0,46	4,2±0,48 ↑	3,19±0,3	3,1±0,3
АФ моноцитов	0,25±0,02	0,33±0,05	0,49±0,03 ↑*	0,45±0,05 ↑	0,27±0,03 ↑*	0,28±0,04 ↑
БА %	41,2±3,1	35,48±1,7 ↓	36,8±2,3	38,2±1,5	41,8±2,7	33,7±3,02 ↓
НСТ, спонтанный %	15,4±2,0 ↑*	12,04±1,5 ↑	6,47±0,7 ↓*	7,7±1,6	13,2±2,02	9,5±1,86
НСТ, стимулирован. %	20,4±2,3	20,9±2,4	12,4±0,9 ↓*	16,9±2,57	21,4±3,04	16,0±2,75
IgG, г/л	11,0±0,69	9,5±0,6	8,7±0,6 ↓*	9,2±0,67 ↓	11,8±1,3	10,35±1,4
IgA, г/л	1,63±0,17 ↓*	1,4±0,12 ↓	1,23±0,2	1,14±0,2	1,8±0,19	1,75±0,2
IgM, г/л	1,66±0,11 ↑*	1,67±0,11 ↑	1,5±0,1 ↑*	1,8±0,18 ↑**	2,0±0,21 ↑*	2,2±0,2 ↑
ЦИК, ед.	72,8±5,4	72,1±5,1	61,1±6,8	49,5±4,3 ↓	94,1±13,4	84,4±14,3
CD20	0,38±0,03	0,29±0,03 ↓	0,35±0,04	0,3±0,04	0,23±0,03	0,26±0,03
CD3	1,37±0,11 ↓*	1,44±0,08 ↓	1,45±0,12	1,5±0,25	1,3±0,14 ↓*	1,46±0,1 ↓
CD4	0,84±0,07	0,87±0,04	0,79±0,07 ↓*	0,92±0,13	0,83±0,11	0,94±0,09
CD8	0,45±0,04 ↓*	0,5±0,04 ↓	0,55±0,05	0,74±0,11↑	0,43±0,05 ↓*	0,44±0,05 ↓
NK	0,12±0,01 ↓*	0,08±0,009 ↓**	0,37±0,04	0,33±0,08	0,15±0,02 ↓*	0,16±0,026 ↓

Примечание: * - p<0,05 при сопоставлении с показателем возрастной нормы; ** - p<0,05 при сравнении показателей в динамике

Таблица 4

Динамика уровня ИФН γ -, ИЛ2-, ИЛ4-, ФНО α - продуцирующих Т-лимфоцитов при энтеровирусном менингите у подростков, детей и взрослых пациентов

Показатель $\times 10^9/\text{л}$	Подростки n=36		Дети n=16		Взрослые n=37	
	I неделя	III неделя	I неделя	III неделя	I неделя	III неделя
CD3 ⁺ /ИФН γ ⁺ спонт., $10^9/\text{л}$	0,026 \pm 0,004	0,024 \pm 0,004 ↓	0,043 \pm 0,005	0,039 \pm 0,006	0,033 \pm 0,006	0,03 \pm 0,01
CD3 ⁺ /ИФН γ ⁺ стим., $10^9/\text{л}$	0,25 \pm 0,03 ↓*	0,18 \pm 0,02 ↓	0,42 \pm 0,06	0,35 \pm 0,07	0,26 \pm 0,03 ↓*	0,3 \pm 0,05
CD3 ⁺ /ФНО α ⁺ спонт., $10^9/\text{л}$	0,18 \pm 0,04 ↑*	0,11 \pm 0,02 ↑	0,07 \pm 0,008	0,08 \pm 0,016	0,06 \pm 0,01 ↓*	0,16 \pm 0,07
CD3 ⁺ /ФНО α ⁺ стим., $10^9/\text{л}$	0,41 \pm 0,07 ↓*	0,27 \pm 0,03 ↓	0,48 \pm 0,05 ↓*	0,47 \pm 0,08 ↓	0,39 \pm 0,04 ↓*	0,4 \pm 0,05 ↓
CD3 ⁺ /ИЛ2 ⁺ спонт., $10^9/\text{л}$	0,03 \pm 0,006	0,03 \pm 0,006	0,04 \pm 0,009	0,042 \pm 0,007	0,035 \pm 0,006	0,06 \pm 0,025
CD3 ⁺ /ИЛ2 ⁺ стим., $10^9/\text{л}$	0,16 \pm 0,02 ↓*	0,08 \pm 0,01 ↓**	0,19 \pm 0,03 ↓*	0,47 \pm 0,28	0,16 \pm 0,02 ↓*	0,14 \pm 0,03 ↓
CD3 ⁺ /ИЛ4 ⁺ спонт., $10^9/\text{л}$	0,06 \pm 0,01 ↑*	0,08 \pm 0,03	0,04 \pm 0,006 ↑*	0,045 \pm 0,007 ↑	0,037 \pm 0,006 ↑*	0,03 \pm 0,01
CD3 ⁺ /ИЛ4 ⁺ стим., $10^9/\text{л}$	0,037 \pm 0,004	0,03 \pm 0,005	0,06 \pm 0,007	0,07 \pm 0,01	0,037 \pm 0,004 ↓*	0,04 \pm 0,01 ↓

Примечание: * - $p < 0,05$ при сопоставлении с показателем возрастной нормы; ** - $p < 0,05$ при сравнении показателей в динамик

Таким образом, в острый период заболевания у подростков низкий уровень NK-клеток и цитотоксических лимфоцитов при сохраненной или повышенной продукции провоспалительных цитокинов, могут свидетельствовать о потреблении этих клеток в ходе иммунных реакций или о супрессии клеточно-опосредованных механизмов иммунного ответа, вызванной воздействием вируса на иммунокомпетентные клетки и/или на фоне гормонального дисбаланса в пубертатном периоде.

Преимущественную направленность иммунного ответа по Th2-типу подтверждают отрицательные значения индекса поляризации в острый период и период ранней реконвалесценции (рис.8).

Для уточнения особенностей иммунологических реакций при энтеровирусном менингите у пациентов подросткового возраста было проведено исследование иммунологических показателей при энтеровирусном менингите у детей и взрослых больных.

При энтеровирусном менингите у детей, в отличие от подростков, выявлено повышение числа моноцитов периферической крови в острый период ($p < 0,00001$) и период ранней реконвалесценции ($p < 0,0001$), повышение уровня функционально активных моноцитов ($p < 0,0001$), участвующих в фагоцитозе ЦИК (рис.7, таб.3).

Снижения уровня лимфоцитов периферической крови, в том числе CD3-, CD8-, CD16-лимфоцитов в детской группе не отмечено. Имело место транзиторное снижение числа CD4-лимфоцитов в острый период заболевания ($p < 0,05$) (рис.7, таб.3). Возможно, это связано с высоким потенциалом клеточного звена иммунитета у детей.

Иммунологическая перестройка, в ответ на воздействие антигена в острую стадию заболевания у детей с энтеровирусным менингитом, связана в большей степени с функциональной активностью цитокин-продуцирующих клеток, чем с их уровнем. Так выявлена содружественная реакция между функциональной активностью CD3⁺/IFN γ ⁺-лимфоцитов и уровнем цитоток-

сических лимфоцитов ($r=0,58$; $p<0,05$), синергизм функциональной активности $CD3^+/TNF\alpha^+$ - лимфоцитов и уровня NK-клеток ($r=0,65$; $p<0,05$).

Высокая функциональная активность $CD3^+/IL4^+$ - лимфоцитов, наблюдаемая у детей, возможно, оказывает супрессивное действие на уровень естественных киллеров ($r=-0,65$; $p<0,05$), поглотительную активность моноцитов ($r=-0,63$; $p<0,05$), что может способствовать задержке санации ликвора ($r=-0,77$; $p<0,05$).

Иммунологическая перестройка в старшей возрастной группе характеризовалась сочетанием моноцитоза ($p<0,05$), повышения фагоцитарной активности моноцитов ($p<0,05$), как у детей, и лейкопении ($p<0,01$), как у подростков, со снижением уровня Т-клеток преимущественно за счет $CD3^-$, $CD8^-$, и $CD16^-$ -лимфоцитов ($p<0,01$), (рис.7, таб.3).

В острый период энтеровирусной инфекции у взрослых пациентов, как и у подростков, не отмечается изменения числа $CD3^+$ -лимфоцитов, содержащих в цитоплазме $IFN\gamma$, $IL2$ при спонтанном синтезе, но в отличие от подростков наблюдается снижение $CD3^+/TNF\alpha^+$ - лимфоцитов ($p<0,05$).

Во всех группах наблюдения адаптивные реакции гуморального иммунитета осуществляются с преимущественным участием IgM, и в течение первых трех недель заболевания, что характеризует первичный иммунный ответ.

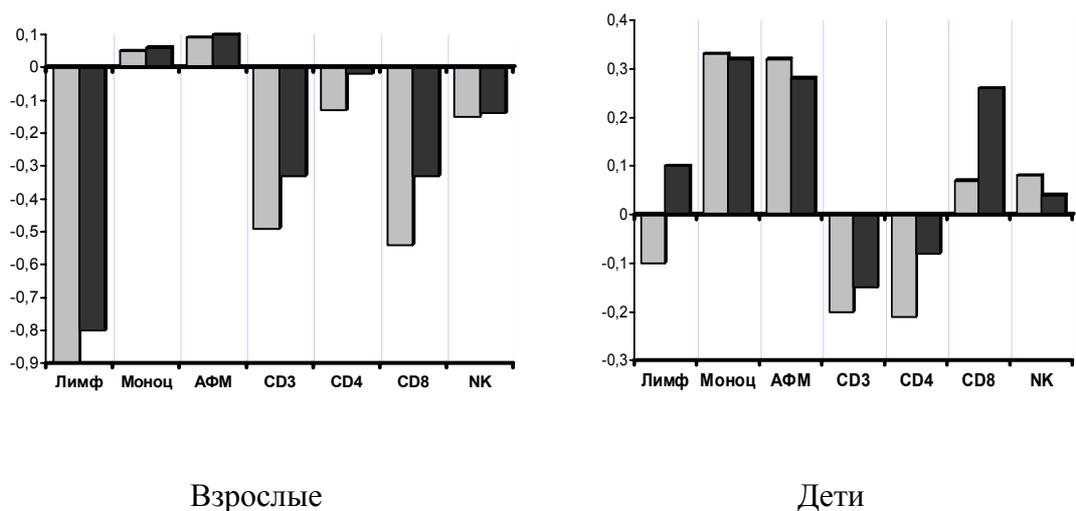


Рисунок 7. Динамика уровня показателей неспецифического и клеточного звена иммунитета у детей и взрослых с энтеровирусным менингитом на I, III неделе заболевания (по отношению к возрастной норме).

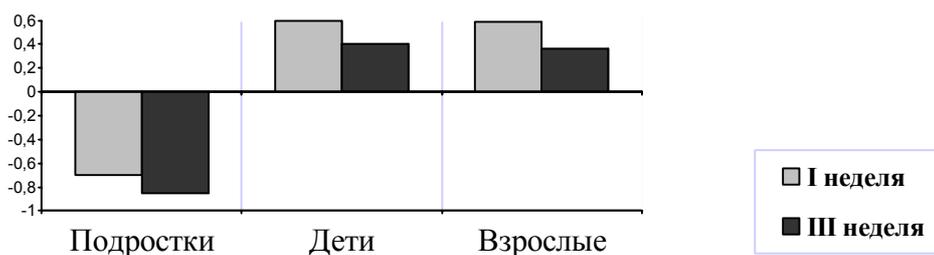


Рисунок 8. Индекс поляризации у подростков, детей и взрослых при энтеровирусном менингите на I и III неделе заболевания

В острый период и период реконвалесценции у детей и у взрослых преобладает число больных с положительными значениями индекса поляризации, что свидетельствует о преобладании клеточно-опосредованных механизмов в формировании иммунного ответа при энтеровирусном менингите (рис.8).

Общеизвестно, что основные клинические симптомы при энтеровирусном менингите купируются в течение первой недели заболевания. Показателем выздоровления считается нормализация показателя плеоцитоза ликвора. Проведенное исследование выявило, что у 52% пациентов подросткового возраста на 18-20 день заболевания уровень цитоза ликвора превышает $20 \times 10^6/\text{л}$. Для выявления факторов, оказывающих преимущественное влияние на сроки выздоровления, проведен анализ зависимости времени санации ликвора от показателей врожденного и адаптивного иммунитета.

При анализе таблицы сопряженности цитоза ликвора (цитоз < 20 клеток и > 20 клеток) и показателей гемо-, иммунограммы выявлены следующие закономерности у пациентов подросткового возраста:

1) при снижении стартового уровня лимфоцитов периферической крови ниже $2,0 \times 10^9/\text{л}$ не наблюдалось санации ликвора на третьей неделе заболевания: $\chi^2=4,7$; $p<0,05$ в 64% случаев;

2) при условии одновременного снижения стартового уровня НК и цитотоксических лимфоцитов у пациентов подросткового возраста с энтеровирусным менингитом в сроки 18-20 день болезни не происходит санация ли-

квора (цитоз >20 клеток) с достоверностью 82%: $\chi^2=12,69$; $p<0,001$. Плеоцитоз ликвора составил $M-42,8$; $\sigma-17,2$; $m-6,0 \times 10^6/\text{л}$. Поздняя санация ликвора наблюдалась при стартовом показателе CD8-лимфоцитов $\leq M-0,41$; $\sigma-0,18$; $m-0,028 \times 10^9/\text{л}$ и стартовом показателе NK-клеток $\leq M-0,07$; $\sigma-0,027$; $0,008 \times 10^9/\text{л}$. При показателе NK ниже $0,097 \times 10^9/\text{л}$ во всех случаях не отмечено санации ликвора на 18-20 день болезни.

3) при условии сохранения уровня стартовых показателей цитотоксических лимфоцитов и NK-клеток в пределах возрастной нормы или выше, цитоз ликвора на третьей неделе заболевания был менее 20 клеток с вероятностью 100% и составил на 18-20 день: $M-11,0$; $\sigma-4,1$; $m-1,4 \times 10^6/\text{л}$;

У пациентов групп сравнения – взрослые и дети анализ влияния показателей врожденного и приобретенного иммунитета выявил следующие закономерности:

1) при условии санации ликвора на третьей неделе заболевания цитоз у взрослых больных составил: $M-13,4$; $\sigma-5,02$; $m-2,2 \times 10^6/\text{л}$, при отсутствии санации ликвора: $M-38,4$; $\sigma-16,6$; $m-6,3 \times 10^6/\text{л}$, достоверность различий $p<0,05$.

2) при условии одновременного снижения стартового уровня NK и цитотоксических лимфоцитов у взрослых больных наблюдается задержка санации ликвора; $\chi^2=3,6$; $p<0,05$ в 55% случаев.

3) не выявлено зависимости времени санации ликвора от стартового уровня цитотоксических лимфоцитов и естественных киллеров у пациентов детской группы.

Таким образом, установлено два варианта иммунного реагирования при ЭМ у подростков в зависимости от стартового уровня NK-клеток и цитотоксических лимфоцитов.

При первом типе реагирования, когда число естественных киллеров и цитотоксических лимфоцитов соответствовало или превышало нормативные значения, санация ликвора наступала в стандартные сроки к 18-20 дню заболевания.

Второй тип реагирования характеризовался низкими стартовыми значениями NK-клеток ($\leq M-0,07$; $\sigma-0,027$; $0,008 \times 10^9/\text{л}$) и цитотоксических лимфоцитов ($\leq M-0,41$; $\sigma-0,18$; $m-0,28 \times 10^9/\text{л}$) и как следствие – поздняя санация ликвора. Плеоцитоз ликвора на 18-20 день заболевания составил: $M-42,8$; $\sigma-17,2$; $m-6,0 \times 10^6/\text{л}$.

Потенцирующие связи между уровнем естественных киллеров и уровнем моноцитов ($p < 0,05$; $r = 0,85$), между уровнем CD8-лимфоцитов, моноцитами периферической крови ($p < 0,05$; $r = 0,98$) и их фагоцитарной активностью ($p < 0,05$; $r = 0,85$), в обеих группах, свидетельствуют о преимущественной зависимости времени санации ликвора от показателей врожденного иммунитета.

Итак, проведенные нами исследования и полученные результаты, позволяют сделать следующее заключение: при инфицировании макроорганизма энтеровирусами и развитии болезни наблюдается супрессия клеток-эффекторов, участвующих в формировании врожденного и приобретенного клеточного иммунитета. Снижение численности CD8 – и CD16 - лимфоцитов, которое может быть исходным, до заражения, или наведенным, так как вирус Коксаки обладает свойством подавлять функциональные способности этих клеток, благоприятствует генерализации процесса и может приводить к развитию менингита и отнюдь не означает, что развитие болезни принимает неблагоприятное течение. Формирование гуморального и клеточного специфического иммунитета приводит к выздоровлению.

Выводы:

1. У больных энтеровирусным менингитом подросткового возраста преобладает классическая картина заболевания, которая по характеристике начального периода не соответствует течению заболевания у взрослых больных, а по длительности наблюдаемых симптомов отличается от течения заболевания у детей.

2. Особенностью иммунологической перестройки при энтеровирусном менингите у подростков и взрослых больных, в отличие от детей, является снижение показателей клеточного звена иммунитета: CD3⁻, CD8 – CD16 - лимфоцитов на протяжении трех недель заболевания.
3. В острый период заболевания у подростков определяется нормальный уровень CD3⁺-лимфоцитов, содержащих в цитоплазме IFN γ и IL2, повышенный уровень CD3⁺-лимфоцитов, содержащих TNF α и IL4 цитокины, но наблюдается снижение функциональной активности всех популяций CD3⁺ - лимфоцитов.
4. Выраженность симптомов инфекционного токсикоза, в острый период заболевания, уровень плеоцитоза ликвора и длительность выявления менингеальных симптомов у подростков, обусловлены стартовым уровнем CD3⁺ - клеток, содержащих эндоплазматические провоспалительные цитокины.
5. Время санации ликвора у подростков преимущественно зависит от стартового уровня NK-клеток и цитотоксических лимфоцитов.

Практические рекомендации:

1. Снижение уровня лимфоцитов периферической крови $\leq 2 \times 10^9/\text{л}$ является показанием к исследованию иммунного статуса.
2. При отсутствии возможности исследования иммунного статуса, уровень лимфоцитов периферической крови $\leq 2 \times 10^9/\text{л}$, является показанием к отсроченному проведению контрольной люмбальной пункции.
3. Снижение уровня натуральных киллеров и цитотоксических лимфоцитов или снижение уровня натуральных киллеров $\leq 0,097 \times$ является показанием к отсроченному проведению контрольного исследования ликвора.
4. При нормативном уровне NK-клеток и цитотоксических лимфоцитов люмбальная пункция может быть проведена в стандартные сроки (18-20 день заболевания).

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Возрастные иммунологические аспекты менингеальной формы энтеровирусной инфекции / Бацкалевич Н.А., Хаманова Ю.Б., Чеснакова О.А., Лагерева Ю.Г. // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2009. - №2/1 (24). – С. 29-30.
2. Оценка показателей иммунитета в обосновании иммуотропной терапии при энтеровирусном менингите / Н.А. Бацкалевич, В.К. Веревищников, Ю.Г. Лагерева // Инфекционные болезни. – 2009. - № . – С. 20-24.
3. Клиническая, иммунологическая характеристика энтеровирусного менингита у подростков / В.В.Фомин, Н.А. Бацкалевич, Ю.Б. Хаманова, Ю.Г. Лагерева // Современные проблемы науки и образования. – 2009. - №6. – С. 21.
4. Энтеровирусная инфекция // Детские инфекционные болезни у подростков: Учеб.-метод. пособие для врачей / Под ред. В.В. Фомина, А.И. Ольховикова, С.А. Царьковой, Э.А.Кашубы. – Екатеринбург, 2005. – С. 83-87.
5. Клинические и иммунологические особенности течения энтеровирусной инфекции у подростков / Н.А. Бацкалевич, Е.К. Шемякина, Ю.Г. Лагерева // Сб. научн. тр. сотр. МУ «ГКБ №40». – Екатеринбург, 2008. – С. 161-162.

Список сокращений:

ИФН, IFN	- интерферон
CD3	- рецептор, определяющий Т-лимфоциты
CD4	- рецептор, определяющий Т-хелперы
CD8	- рецептор, определяющий цитотоксические Т-лимфоциты
ФНО, TNF	- фактор некроза опухоли
ЦИК	- циркулирующие иммунные комплексы
Ig	- иммуноглобулин

ИЛ, IL	- интерлейкин
CD16, NK	- натуральные киллеры
Th1, Th2	- хелперы первого, второго типа
ЭМ	- энтеровирусный менингит