

**В.В. Фомин, О.А. Чеснакова,
Ю.Б. Хаманова, Я.Б. Бейкина,
Ю.Г. Лагерева, Л.Г. Беседина**
*Уральская государственная
медицинская академия,
Институт иммунологии
и физиологии УрО РАН,
Центр лабораторной диагностики*

СОСТОЯНИЕ ЦИТОКИНОВОЙ СИСТЕМЫ ПРИ МЕНИНГИТАХ ЭНТЕРОВИРУСНОЙ ЭТИОЛОГИИ

На фоне ликвидации полиомиелита более актуальной становится проблема неполиомиелитных энтеровирусных инфекций (ЭВИ), которые проявляют тенденцию к нарастающему развитию и являются частыми заболеваниями, особенно в детском возрасте. Некоторые исследователи считают, что широкая активизация энтеровирусов связана с вакцинацией против полиомиелита. Этиология, эпидемиология, клиника этих заболеваний достаточно полно освещены в отечественной и зарубежной литературе, однако малоизученными остаются состояние иммунокомпетентных клеток и их цитокинсинтезирующая способность.

Цель работы – оценить состояние иммунокомпетентных клеток и цитокинсинтезирующей способности Т-лимфоцитов при менингитах энтеровирусной этиологии.

Материалы и методы исследования

Под наблюдением находилось 290 детей с диагнозом ЭВИ, менингеальная форма, лечившихся в детском инфекционном отделении ГКБ № 40 летом 2004 г. Детей до 3-х лет было 19 человек (6,5 %), от 3-х до 7 лет – 71 человек (24,5 %), от 7 до 14 лет – 164 человека (56,5 %), старше 14 лет – 36 человек (12,4 %). Среди заболевших преобладали мальчики – 60 %. Максимальное число заболеваний было зарегистрировано в летне-осенний период (июль – 30 % от общего числа заболевших, август – 33 %, сентябрь – 24 %, октябрь – 13 %). В эпидемический процесс были вовлечены преимущественно дети школьного возраста (56 %). Отмечалась характерная для ЭВИ высокая очаговость, различные пути передачи инфекции, в частности водный и контактно-бытовой.

Клиническая картина энтеровирусного менингита не отличалась от описанной нами ранее (1, 3) и характеризовалась общемоз-

говой симптоматикой у 98 % детей, менингеальными симптомами – у 90 %, общеинфекционным синдромом – у 98 %, сыпью и герпангиной – у 17 %, катаральным синдромом – у 98 % детей. Длительность симптомов составляла 1–4 дня, реже 7–9 суток. Особенности клинической картины в зависимости от возраста нами не получено. 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» (ABX). Фенотипирование лимфоцитов осуществлялось методом прямой иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител производства ООО «Сорбент» (г. Москва). Регистрация результатов проводилась методом лазерной проточной цитометрии на цитофлюометре «FacsCan» («Becton Dickinson»). Для оценки внутриклеточного синтеза цитокинов мононуклеары периферической крови получали путем выделения на градиенте плотности фиколл-верографина ($1,077 \text{ г/см}^3$). Спонтанную продукцию ИЛ2, ИЛ4, ИФН- γ и ФНО- α Т-лимфоцитами оценивали по истечении 4 часов инкубации в присутствии брэфельдина А при 37°C , в атмосфере 5 % CO_2 . В качестве активатора для стимуляции внутриклеточного синтеза использовали РМА («Sigma», 50 ng/ml) плюс иономицин («Sigma», 1 $\mu\text{g/ml}$). 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») [2]. 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). Концентрации иммуноглобулинов IgG, IgM, IgA в сыворотке крови определяли методом радиальной иммунодиффузии в агаре по Mancini (1965). Содержание ЦИК оценивали методом преципитации в растворе ПЭГ-6000 (Гриневич, 1981). Соотношение Th1/Th2 определяли как разность между CD3+/ γ IFN+ и CD3+/IL4, деленную на CD3+/IL4+. Полученные данные обрабатывались с помощью программного пакета MS Office 98.

Результаты исследования и их обсуждение

В остром периоде болезни (с 1 по 10 день) в крови наблюдались лейкопения, нейтропения, лимфопения, моноцитоз, в иммунограмме – снижение уровня CD3-, CD4-, CD8-лимфоцитов, повышение активности фагоцитоза моноцитов, уровня IgM и ЦИК, что соответствовало первичному иммунному ответу.

В динамике болезни (15–16 день) сохранялась умеренная лимфопения, CD3- и CD8-лимфопения, моноцитоз, повышенная активность фагоцитоза моноцитов и высокий уровень IgM, происходила нормализация CD4-лимфоцитов, нарастал уровень нейтрофилов, эозинофилов и снижался НСТ-тест (табл. 1). Аналогичные изменения описывались нами и ранее (1).

Таблица 1

Иммунологические показатели у больных энтеровирусной инфекцией

Показатель	Здоровые дсти	Больные менингитом	
		1-с исследованием	2-с исследованием
	M ± m	M ± m	M ± m
Лейкоциты 10 ⁹ /л	7,6 ± 0,55	6,3 ± 0,31*	6,78 ± 0,26
Лимфоциты 10 ⁹ /л	3,6 ± 0,12	2,69 ± 0,19*	3,0 ± 0,16*
Гранулоциты 10 ⁹ /л	3,7 ± 0,44	3,13 ± 0,20	3,3 ± 0,19
Моноциты 10 ⁹ /л	0,25 ± 0,04	0,47 ± 0,03*	0,47 ± 0,02*
Аф нейтрофил.10 ⁹ /л	3,52 ± 0,43	3,82 ± 0,80	3,10 ± 0,16
Аф нейтрофилов %	93,4 ± 1,5	96,2 ± 0,33	95,3 ± 0,97
Аф моноцитов 10 ⁹ /л	0,21 ± 0,04	0,43 ± 0,02*	0,42 ± 0,02*
Аф моноцитов %	77,5 ± 2,98	91,7 ± 0,76*	88,5 ± 1,12*
БА	33,45 ± 5,92	43,4 ± 6,56	36,76 ± 2,07
НСТ сп. ед	18,65 ± 2,76	13,4 ± 1,33	10,41 ± 1,25*
Ig G г/л	9,5 ± 0,28	9,81 ± 0,54	9,21 ± 0,46
Ig M г/л	0,9 ± 0,03	1,54 ± 0,12*	1,45 ± 0,11*
Ig A г/л	1,0 ± 0,05	1,08 ± 0,11	1,16 ± 0,12
ЦИК ед	31,3 ± 3,4	105,97 ± 36,03*	56,05 ± 4,32
CD3 10 ⁹ /л	2,5 ± 0,08	1,83 ± 0,13* **	2,18 ± 0,12* **
CD20 10 ⁹ /л	0,5 ± 0,03	0,49 ± 0,04	0,49 ± 0,04
CD4 10 ⁹ /л	1,2 ± 0,04	0,93 ± 0,07* **	1,22 ± 0,06**
CD8 10 ⁹ /л	0,9 ± 0,03	0,72 ± 0,07*	0,75 ± 0,06*
NK 10 ⁹ /л	0,3 ± 0,02	0,37 ± 0,04	0,30 ± 0,04

* – p < 0,05 по сравнению с контрольной группой.

** – p < 0,05 в динамике болезни.

В 2004 г. нами впервые была предпринята попытка изучения цитокинсинтезирующей способности Т-лимфоцитов у больных данной группы (табл. 2).

Таблица 2

Показатели цитокиновой системы при энтеровирусной инфекции

Показатель	Здоровые дети		Больные менингитом				
	M ± m	индекс стимуляции	1-е исследование		2-е исследование		
			M ± m	индекс стимуляции	M ± m	индекс стимуляции	
		M ± m					M ± m
CD3+/ γ IFN+	сп.	0,02 ± 0,003	24,0 ± 2,7	0,09 ± 0,01*	7,37 ± 1,2*	0,09 ± 0,01*	6,25 ± 0,9*
CD3+/ γ IFN+	ст.	0,52 ± 0,044		0,65 ± 0,09		0,62 ± 0,07	
CD3+/TNF α +	сп.	0,03 ± 0,004	20,5 ± 1,9	0,13 ± 0,01**	7,29 ± 1,46*	0,09 ± 0,01**	8,3 ± 0,98*
CD3+/TNF α +	ст.	0,625 ± 0,05		0,92 ± 0,13*		0,86 ± 0,12	
CD3+/ $\text{IL}2$ +	сп.	0,03 ± 0,004	19,3 ± 3,3	0,11 ± 0,01**	6,74 ± 1,05*	0,08 ± 0,01**	5,8 ± 0,7*
CD3+/ $\text{IL}2$ +	ст.	0,48 ± 0,041		0,51 ± 0,05		0,43 ± 0,03	
CD3+/ $\text{IL}4$ +	сп.	0,016 ± 0,003	2,2 ± 0,215	0,07 ± 0,01**	2,7 ± 0,57	0,10 ± 0,01**	1,86 ± 0,25
CD3+/ $\text{IL}4$ +	ст.	0,039 ± 0,006		0,16 ± 0,03*		0,13 ± 0,01*	
Th1/Th2		0,25		0,28		-0,1	

* – $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.** – $p < 0,05$ в динамике болезни.

В первые 10 дней болезни было выявлено повышение спонтанной цитокинсинтезирующей способности Т-клеток: CD3+/ γ IFN+, CD3+/TNF α +, CD3+/IL2+, CD3+/IL4+-лимфоцитов, уровень их превышал нормативные показатели примерно в 4 раза. Уровень стимулированной цитокинсинтезирующей способности этих же клеток также был повышен, однако менее значительно, чем у здоровых детей: CD3+/ γ IFN+ в 1,2 раза; CD3+/TNF α + – в 1,5 раза; CD3+/IL2+ – в 1,1 раза; CD3+/IL4+ – в 4,1 раза.

Коэффициент стимуляции провоспалительных цитокинов (CD3+/ γ IFN+, CD3+/TNF α +, CD3+/IL2+) при этом был снижен по сравнению со здоровыми детьми в 3,3; 2,8; 2,8 раза соответственно, а противовоспалительного цитокина CD3+/IL4+ был несколько повышен. В динамике болезни сохранялось повышение цитокинсинтезирующей способности Т-лимфоцитов, хотя и происходило некоторое снижение уровня CD+/TNF+, CD3+/IL2+, повышение CD3+/IL4+-лимфоцитов, а уровень CD3+/ γ IFN+ не изменялся.

Представляется, что указанные изменения отражают вирусиндуцированную антигеннеспецифическую модуляцию иммунного ответа. Как реакция на воздействие вирусов в организме возникает увеличение CD3+-лимфоцитов с провоспалительной цитокинсинтезирующей активностью. Эти цитокины активируют макрофагальное звено, что проявляется в увеличении количества моноцитов и усилении их фагоцитарной активности. Данные изменения прослеживаются на протяжении всего периода болезни. Об адекватности иммунного ответа свидетельствует и нарастание уровня IgM. Лимфопения, снижение уровня CD3- и CD4-лимфоцитов носит транзиторный характер, их показатели практически нормализуются в динамике болезни. Синтез противовоспалительных цитокинов в ходе болезни также увеличивается, о чем свидетельствует нарастание уровня CD3+/IL4+-лимфоцитов в 4,4 раза в первые дни болезни и в 6,2 раза на 2–3 неделе. Эти данные свидетельствуют о возрастающей роли Th2-типа и усилении роли гуморального звена в процессе энтеровирусной инфекции. Соотношение Th1/Th2 в ходе болезни изменяется: в первые дни оно равно 0,28, что прак-

тически соответствует данному показателю у здоровых детей (0,25) и свидетельствует о поляризации иммунного ответа в сторону клеточного звена, на 3-й неделе болезни этот показатель снижается до $-0,1$, что обусловлено преимущественным увеличением CD3+/IL4+-клеток и указывает на поляризацию иммунного ответа по гуморальному типу в этом периоде болезни. Гранулоцитарное звено, вероятно, не играет заметной роли в процессе выздоровления, о чем косвенно свидетельствует отсутствие сколько-то заметных изменений со стороны количества гранулоцитов, активности фагоцитоза нейтрофилов, а снижение НСТ-теста на 2–3 недели болезни может свидетельствовать о повреждающем действии энтеровирусов на клетки миелопоэтической системы. Таким образом, в процессе элиминации вируса при энтеровирусной инфекции принимают участие оба звена иммунитета – клеточное и гуморальное, происходит лишь некоторая поляризация в сторону клеточного звена на раннем этапе болезни и в сторону гуморального звена – в периоде выздоровления.

Обращает на себя внимание тот факт, что увеличение спонтанной цитокинсинтезирующей способности CD3+/ γ IFN+ и CD3+/TNF α + клеток сопровождалось снижением индекса стимуляции ($r = -0,33$; $p < 0,05$; и $r = -0,4$; $p < 0,01$), т. е. между этими показателями существует обратно пропорциональная зависимость. Можно предположить, что если в результате инфекции у больного происходит повышение под действием вируса спонтанной экспрессии цитокинов, то резервные возможности клеток снижаются, о чем свидетельствует снижение индекса стимуляции, и возникает больший риск развития осложнений и «негладкого» течения болезни, так как резервные возможности иммунокомпетентных клеток снижаются (табл. 3). Данные различия выявлены у больных обеих групп только в первые дни болезни, в динамике эти различия исчезают, что свидетельствует о скорой обратимости изменений, вызванных энтеровирусами. О меньшей целесообразности поляризации ответа по Th2-типу свидетельствует и различие индекса Th1/Th2 при «гладком» и «негладком» течении болезни: 0 против $-0,4$.

Индекс стимуляции при различных вариантах течения болезни

Индекс стимуляции	Течение болезни	
	«гладкое», M ± m	«несплодное», M ± m
CD3+/γIFN+	10,3 ± 2,37 *	4,6 ± 0,6 *
CD3+/TNFα+	6,95 ± 1,8 *	2,76 ± 0,35 *
CD3+/IL2+	8,28 ± 2,0	4,59 ± 0,6
CD3+/IL4+	3,45 ± 1,28	2,2 ± 0,36

* – $p < 0,05$.

Нами не получено достоверных отличий в клинической картине болезни в зависимости от уровня цитокинсинтезирующей способности Т-лимфоцитов. Однако распределение больных на 2 группы в зависимости от уровня плеоцитоза в ликворе позволило выявить некоторые различия. Так, в группе больных с уровнем плеоцитоза свыше $500 \times 10^6/\text{л}$ определялся более высокий спонтанный и стимулированный синтез CD3+/γIFN+-клеток – $0,11 \pm 0,03$ и $0,82 \pm 0,19$ против $0,06 \pm 0,008$ и $0,39 \pm 0,05$ у больных с более низким уровнем плеоцитоза ($p_1 > 0,05$; $p_2 < 0,05$), более высокий уровень НК-клеток – $0,66 \pm 0,14$ против $0,28 \pm 0,04$ ($p < 0,05$) и более низкий НСТ-тест, как спонтанный – $7,7 \pm 1,2$ против $14,2 \pm 1,7$ ($p < 0,05$), так и стимулированный – $19,8 \pm 2,2$ против $28,9 \pm 2,3$ ($p < 0,05$). Все остальные показатели у них были также выше, чем в группе с низким уровнем плеоцитоза, но различия не были статистически достоверными. В динамике болезни все различия исчезали, за исключением уровня НК-клеток, который оставался значительно выше – $0,54 \pm 0,12$ против $0,25 \pm 0,05$ ($p < 0,05$). Данные различия, вероятно, отражают большую тяжесть болезни, обусловленную свойствами возбудителя. Однако следует отметить, что все больные указанной группы были лицами мужского пола.

Выводы

1. Под действием энтеровирусов происходит усиление выработки цитокинсинтезирующих Т-лимфоцитов как провоспалительной, так и противовоспалительной направленности.

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.* Энтеро-вирусные 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-