

ОСНОВНЫЕ И МАЛЫЕ СУБПОПУЛЯЦИИ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ И ЦЕРЕБРОСПИНАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ МЕНИНГИТАХ У ДЕТЕЙ

А.А. Жирков¹, Л.А. Алексеева¹, Г.Ф. Железникова¹, Н.В. Скрипченко^{1,2},
Н.Е. Монахова¹, Т.В. Бессонова¹

¹ ФГБУ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет,
Санкт-Петербург, Россия

Резюме. *Введение.* Анализ современных литературных данных указывает на недостаточную изученность субпопуляционного состава лимфоцитов крови и цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) при нейроинфекциях у детей. Установлено, что клетки основных популяций лимфоцитов делятся на множество малых (минорных) субпопуляций. *Цель данного исследования* — изучить относительное содержание основных и малых субпопуляций лимфоцитов крови и ЦСЖ детей, переносящих серозный менингит (СМ) (вирусный) или гнойный менингит (ГМ) (бактериальный). *Материалы и методы.* Методом проточной цитометрии проведено фенотипирование лимфоцитов крови и ЦСЖ детей в возрасте от 4 месяцев до 17 лет с диагнозом СМ (n = 86) и ГМ (n = 39). В качестве сравнения исследованы образцы крови и ЦСЖ детей, переносящих ОРВИ с синдромом менингизма (n = 27). Исследовано относительное содержание основных субпопуляций: CD3⁺ Т-лимфоцитов, Т-хелперов — CD3⁺CD4⁺ Th, цитотоксических Т-лимфоцитов — CD3⁺CD8⁺ CTL, натуральных киллеров — CD3⁻CD16⁺CD56⁺ NK, В-клеток — CD3⁻CD19⁺; малых субпопуляций лимфоцитов: двойных позитивных (DP) (CD3⁺CD4⁺CD8⁺), двойных негативных (DN) (CD3⁺CD4⁻CD8⁻) Т-клеток, NKT (CD3⁺CD16⁺CD56⁺), CD3⁻CD8⁺ NK, CD3⁺CD8^{dim} и CD3⁺CD8^{bright}). *Результаты.* В остром периоде ГМ и СМ в крови и ЦСЖ выявлены достоверные отличия от группы сравнения в содержании основных и малых субпопуляций лимфоцитов. Характерным для субпопуляционного состава лимфоцитов крови при СМ явилось преобладание Т-клеток, Th, CTL, NK, NKT, DN, CD3⁻CD8⁺ NK, CD3⁺CD8^{bright} и CD3⁺CD8^{dim} при существенном более низком содержании В-клеток по сравнению с ГМ. В ЦСЖ детей с СМ превалировали Т-клетки и Th, тогда как количество В-клеток и CD3⁻CD8⁺ NK было ниже по сравнению с показателями при ГМ. В динамике заболевания также выявлены различия субпопуляционного состава ЦСЖ и крови в зависимости от нозологической формы при сохранении отличий от группы сравнения некоторых основных и малых субпопуляций лимфоцитов. Расчет соотношения «ликвор/кровь» для основных и малых субпопуляций лимфоцитов выявил в группе сравнения превалирование в ЦСЖ большинства субпопуляций (коэффициенты варьировали от 1,2 до 16,4), за исключением В-клеток, NK и CD3⁻CD8⁺NK, количество которых в ЦСЖ было сниженным по сравнению с кровью (коэффициенты варьировали от 0,07 до 0,31). При СМ и ГМ происходили различные изменения соотношения

Адрес для переписки:

Жирков Антон Анатольевич
197002, Россия, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 9,
ФГБУ Детский научно-клинический центр инфекционных
болезней ФМБА России.
Тел.: 8 (911) 932-55-32 (моб.).
E-mail: ant-zhirkov@yandex.ru

Contacts:

Anton A. Zhirkov
197002, Russian Federation, St. Petersburg, Prof. Popova str., 9,
Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases
of the Russian Federal Medical-Biological Agency.
Phone: +7 (911) 932-55-32 (mobile).
E-mail: ant-zhirkov@yandex.ru

Для цитирования:

Жирков А.А., Алексеева Л.А., Железникова Г.Ф., Скрипченко Н.В.,
Монахова Н.Е., Бессонова Т.В. Основные и малые субпопуляции
лимфоцитов крови и цереброспинальной жидкости при менингитах
у детей // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 1. С. 111–122.
doi: 10.15789/2220-7619-MAM-1255

Citation:

Zhirkov A.A., Alekseeva L.A., Zheleznikova G.F., Skripchenko N.V.,
Monakhova N.E., Bessonova T.V. Major and minor lymphocytes subpopulations
in peripheral blood and cerebrospinal fluid of children with meningitis //
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021,
vol. 11, no. 1, pp. 111–122. doi: 10.15789/2220-7619-MAM-1255

Работа выполнена при частичной поддержке гранта Комитета по науке и высшей школе правительства Санкт-Петербурга в 2017 году.

«ЦСЖ/кровь» для большинства исследованных субпопуляций в остром периоде и периоде реконвалесценции с характерными особенностями для каждой нозологической формы. *Заключение.* Полученные результаты свидетельствуют о наличии особенностей в активации системного и интратекального иммунного ответа при серозных (вирусных) и гнойных (бактериальных) менингитах у детей и могут быть использованы в качестве дополнительного дифференциально-диагностического критерия.

Ключевые слова: иммунофенотипирование, лимфоциты, минорные субпопуляции, кровь, цереброспинальная жидкость, серозный менингит, бактериальный гнойный менингит, дети.

MAJOR AND MINOR LYMPHOCYTES SUBPOPULATIONS IN PERIPHERAL BLOOD AND CEREBROSPINAL FLUID OF CHILDREN WITH MENINGITIS

Zhirkov A.A.^a, Alekseeva L.A.^a, Zheleznikova G.F.^a, Skripchenko N.V.^{a,b}, Monakhova N.E.^a, Bessonova T.V.^a

^a*Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases of the Russian Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation*

^b*St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation*

Abstract. *Introduction.* The analysis of current publications indicates at our insufficient understanding of subpopulation composition of lymphocytes in peripheral blood and cerebrospinal fluid (CSF) during pediatric neuroinfectious diseases. It has been found that the main lymphocyte populations are divided into many small (minor) subpopulations. The *purpose of this research* was to assess percentage of major and minor blood and CSF lymphocyte subsets in children with aseptic viral meningitis (AM) or bacterial purulent meningitis (BM). *Materials and methods.* Phenotyping of blood and CSF lymphocytes of children aged from 4 months to 17 years diagnosed with AM (n = 86) and BM (n = 39) was carried out by using flow cytometry. As a comparison group, we analyzed peripheral blood and CSF samples collected from children with acute respiratory viral infections (ARVIs) associated with syndrome of meningism (n = 27). There was evaluated percentage of the major cell subpopulations (CD3⁺ T-lymphocytes, T-helpers — CD3⁺CD4⁺ Th, cytotoxic T-lymphocytes — CD3⁺CD8⁺ CTL, natural killer cells — CD3⁻CD16⁺CD56⁺ NK, B-cells — CD3⁻CD19⁺), as well as minor lymphocyte subsets (double positive (DP) (CD3⁺CD4⁺CD8⁺), double negative (DN) (CD3⁺CD4⁻CD8⁻) T-cells, NKT (CD3⁺CD16⁺CD56⁺), CD3⁻CD8⁺ NK, CD3⁺CD8^{dim} and CD3⁺CD8^{bright}). *Results.* It was found that the acute period of BM and AM vs. the comparison group (ARVI) was characterized by significant differences in the blood and CSF composition of major and minor lymphocyte subsets. In particular, blood T-cells, Th, CTL, NK, NKT, DN, CD3⁻CD8⁺ NK, CD3⁺CD8^{bright} and CD3⁺CD8^{dim} dominated in parallel with significantly lowered B-cell frequency in AM vs. BM. In the CSF of children with AM, T-cells and Th prevailed, whereas count of B-cells and CD3⁻CD8⁺ NK was lower compared to those in BM. In addition, further differences were revealed in CSF and blood cell subset composition depending on nosological entity, while maintaining differences in some major and minor lymphocyte subpopulations lacked in the comparison group. Calculating the CSF/blood ratio for the major and minor lymphocyte subsets uncovered the prevalence for the majority of cell subpopulations (the coefficients ranged from 1.2 to 16.4) in the CSF of the comparison group (ARVI), except B-cells, NK and CD3⁻CD8⁺ NK (coefficients ranged from 0.07 to 0.31). AM and BM were featured with various changes in the CSF/blood ratio found for most of the studied subpopulations in the acute period as well as the recovery phase highlighted with characteristic traits for each nosological form. *Conclusion.* The data obtained indicate about finding specific features in the activation of systemic and intrathecal immune response during viral and bacterial meningitis in children, which may be used as an additional differential diagnostic criterion.

Key words: immunophenotyping, lymphocytes, minor subsets, blood, cerebrospinal fluid, aseptic meningitis, bacterial purulent meningitis, children.

Введение

В клинической лабораторной диагностике общепринято оценивать клеточный иммунный ответ на инфекцию путем исследования в биологических жидкостях субпопуляций лимфоцитов (Т, В и натуральных киллеров [NK]). Экспрессия CD4 и CD8 на CD3⁺ клетках является основой для выделения Т-хелперов (Th, CD3⁺CD4⁺) и Т-цитотоксических лимфоцитов (ЦТЛ, CTL, CD3⁺CD8⁺) — главных компонентов адаптивного иммунного ответа. В последние годы установлено, что клетки основных

популяций лимфоцитов делятся на множество малых (минорных) субпопуляций, функции которых изучены недостаточно [5]. В периферической крови и в зоне воспаления находят Т-лимфоциты, негативные по маркерам CD4 и CD8 (Double Negative — DN) либо экспрессирующие на поверхности и тот, и другой антиген (Double Positive — DP). Ранее эти клеточные субпопуляции рассматривали как промежуточные формы созревания Th и CTL. Однако позднее было установлено, что молекулы CD4 и CD8 могут коэкспрессироваться либо отсутствовать на зрелых Т-лимфоцитах, являясь ак-

тивными участниками иммунного ответа [38]. У DP лимфоцитов обнаружены цитотоксический потенциал [21] и иммуносупрессорная активность за счет синтеза противовоспалительных цитокинов (IL-10) [12]. DN (CD4⁻CD8⁻) Т-лимфоциты в зависимости от фенотипа (CD25 и CD44) также проявляют широкий спектр реакций — от продукции провоспалительных цитокинов (IL-2, TNF α , IFN γ) до супрессии антиген-специфического Т-клеточного ответа [12]. На основе разной интенсивности флуоресценции установлена гетерогенность популяции Т-клеток, экспрессирующих CD8 с высокой (CD8^{bright}) и низкой интенсивностью (CD8^{dim} или CD8^{low}). CD3⁺CD8^{bright}- и CD3⁺CD8^{dim}-клетки различаются уровнем экспрессии цитокинов и функциональными характеристиками [12]. Кроме CD3⁺ Т-лимфоцитов, молекула CD8 с низкой интенсивностью может экспрессироваться на CD3⁻ лимфоцитах (CD3⁻CD8^{dim}). Эти клетки экспрессируют CD16 и CD56, являясь одной из субпопуляций NK [10]. Еще одной гетерогенной клеточной субпопуляцией, обладающей цитотоксичностью и рассматриваемой в качестве важного звена врожденного иммунного ответа, выступают NKT-клетки (Natural Killer T-cells). NKT-клетки входят в первую линию защиты от патогенов и обеспечивают связь между врожденным и адаптивным иммунным ответом [30, 31, 32], разделяя обе эти функции с NK [16]. Эксперименты, проведенные на зараженных вирусом мышах, показали, что NKT-клетки реализуют защитную функцию за счет изменения профиля цитокинов и специфического иммунного ответа на вирус [37]. Анализ современных литературных данных указывает на недостаточную изученность функций минорных субпопуляций лимфоцитов, их динамику и диагностическое значение при инфекционной патологии, в частности при нейроинфекциях у детей. Ранее авторами были обнаружены различия состава основных субпопуляций лимфоцитов в крови и ликворе детей, переносящих серозный (вирусный) (СМ) или гнойный (бактериальный) менингит (ГМ) [2]. Представляет интерес сопоставление на большем материале уровня и динамики как основных субпопуляций лимфоцитов, так и ряда малых субпопуляций, возможно, участвующих в патогенезе менингита. Цель настоящей работы — изучить относительное содержание основных (CD3⁺ Т-клеток, CD3⁺CD4⁺ Th, CD3⁺CD8⁺ CTL, CD3⁻CD19⁺ В-клеток, CD3⁻CD16⁺CD56⁺ NK) и малых субпопуляций лимфоцитов (NKT, CD3⁻CD8⁺ NK, DP и DN Т-клеток), а также субпопуляций CTL (CD3⁺CD8^{dim} и CD3⁺CD8^{bright}) в крови и цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) детей, переносящих СМ или ГМ.

Материалы и методы

Проведено параллельное исследование крови и ликвора детей в возрасте от 4 месяцев до 17 лет, поступивших в ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России с диагнозом СМ (n = 86), ГМ (n = 39). Возраст детей в группе с СМ колебался в диапазоне от 0,3 до 17,3 лет, медиана (Me) — 9,5 лет, в группе с ГМ — от 0,3 до 15 лет (Me — 2,9 лет). Для сравнения использованы образцы крови 9 детей в возрасте от 2,4 до 16,3 лет (Me — 12,9 лет) и образцы ликвора 28 детей с острой респираторной вирусной инфекцией (ОРВИ), протекающей с менингеальными симптомами, в возрасте от 2,4 до 17,8 лет (Me — 8 лет). Использованы остатки образцов крови и ликвора, поступающие для стандартного лабораторного исследования (разрешение локального этического комитета: протокол № 93 от 07.11.17). Критерием исключения являлось наличие хронических инфекционных заболеваний (гепатита). В основных группах незначительно преобладали мальчики (66,3 и 58,9% при СМ и ГМ соответственно). В группе сравнения количество мальчиков и девочек было приблизительно равным: при исследовании крови — 44,5% мальчиков и 55,5% девочек, при исследовании ликвора — 46% мальчиков и 54% девочек.

При СМ у 46 детей (54,7%) установлена энтеровирусная природа заболевания, в остальных случаях этиология не установлена. Из 39 детей с ГМ у 24 установлена менингококковая этиология, у 7 — гемофильная, у 7 — стрептококковая; у 1 ребенка этиология ГМ не установлена.

Кровь и ликвор больных исследовали в остром периоде (в течение первых 5 суток от начала болезни) и в периоде ранней реконвалесценции: через 12–15 дней при СМ и 6–13 дней при ГМ, у детей с ОРВИ — однократно в остром периоде заболевания. Забор крови для исследования субпопуляций лимфоцитов осуществляли в вакутейнеры с Li-гепарином. Ликвор, полученный при люмбальной пункции, отбирался в пластиковые пробирки без наполнителя. Исследование субпопуляционного состава крови и ликвора проводилось в день забора биологического материала, спустя не более 2–3 часов.

Стандартное исследование включало определение концентрации общего белка и цитоза с дифференциацией на моно- и полинуклеарные лейкоциты (реагенты «Диахим-Ликвор», НПФ «Абрис+», Санкт-Петербург, Россия). Гематологические исследования выполнены на анализаторе Sysmex XP-300 (Япония). Иммунофенотипирование клеток крови и ликвора проводили на проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с использованием программы MultiSET (Becton Dickinson, США) в автоматическом режиме.

Подготовку образцов крови и ликвора осуществляли согласно инструкции производителя: образцы ликвора центрифугировали в течение 5 минут при 1800 об/мин на центрифуге Heraeus Labofuge 300 (Thermo Scientific, США) и ресуспендировали осадок в 100 мкл ЦСЖ. Основные ($CD3^+$ Т-клетки, $CD3^+CD4^+$ Th, $CD3^+CD8^+$ CTL, $CD3^-CD19^+$ В-клетки, $CD3^-CD16^+CD56^+$ NK) и малые субпопуляции ($CD3^+CD16^+CD56^+$ (NKT), $CD3^+CD4^-CD8^-$ (DN), $CD3^+CD4^+CD8^+$ (DP), $CD3^+CD8^{bright}$, $CD3^+CD8^{dim}$, $CD3^-CD8^+$ NK) идентифицировали с помощью тест-системы BD MultiTEST IMK Kit (кат. № 350503). Обработка данных выполнена в программе FlowJo с применением усовершенствованного способа анализа, позволяющего дополнительно выделять ряд малых субпопуляций лимфоцитов. Алгоритм гейтирования (gating), детально представленный в нашем предыдущем исследовании, был единым для клеток крови и ЦСЖ [4]. В его основу положено последовательное выделение основных и малых субпопуляций на основе характерных клеточных маркеров. Содержание основных и минорных субпопуляций рассчитано относительно числа всех лимфоцитов крови и ликвора с применением программного обеспечения Microsoft Excel. Статистическая обработка данных выполнена с использованием стандартных программ GraphPad Prism 5. Результаты представлены по группам в зависимости от нозологической формы и периода заболевания в виде медианы и межквартильного размаха (Me , Q_{25} – Q_{75}). Для проверки гипотезы нормальности распределения использовали критерий Колмогорова. Для оценки достоверности различий выборок использованы непараметрический U-критерий Манна–Уитни, парный критерий Вилкоксона, критерий Фишера.

Результаты

Анализ содержания основных и малых субпопуляций лимфоцитов крови детей при менингитах выявил различные отклонения от группы сравнения (табл. 1). Так, в остром периоде в группе детей с СМ обнаружено увеличение NK и NKT, снижение $CD4^+$ Th. В динамике содержание Т-клеток и $CD4^+$ Th в крови статистически значимо возрастало, В-лимфоцитов снижалось. При этом содержание $CD4^+$ Th оставалось значительно ниже, а NK, NKT, $CD3^+CD8^{dim}$ Т-клеток — выше показателей группы сравнения. Коэффициент Th/CTL во все периоды СМ был достоверно ниже. При ГМ в остром периоде заболевания в крови выявлено снижение содержания $CD3^+$ Т-лимфоцитов, $CD4^+$ Th и $CD3^+CD8^{dim}$ Т-лимфоцитов относительно уровня показателей в группе сравнения. Напротив, доля $CD19^+$ В-клеток в крови более

чем вдвое превышала аналогичный показатель при ОРВИ. В динамике заболевания содержание $CD3^+$ Т-лимфоцитов, $CD4^+$ Th, CTL и ее фенотипов ($CD3^+CD8^{bright}$ и $CD3^+CD8^{dim}$), DP Т-клеток достоверно увеличивалось, а доля В-лимфоцитов сокращалась. Коэффициент Th/CTL в оба периода заболевания не отличался от показателя в группе сравнения.

В связи с наличием возрастных особенностей состава крови, полученные результаты рассматривались не только в целом по группам СМ и ГМ, но и в соответствии с возрастом согласно общепринятой классификации возрастных периодов развития человека. В группе с СМ дети были представлены в 3 возрастных подгруппах (2–5, 6–11, 12–18 лет), тогда как при ГМ в 4 (3–12 месяцев, 1–2 года, 2–5 и 6–11 лет). Данные о субпопуляционном составе лимфоцитов крови больных с СМ и ГМ сравнивали с литературными данными нормы у детей разного возраста, включающими только основные субпопуляции [33].

Анализ полученных данных субпопуляционного состава лимфоцитов крови у детей разного возраста с СМ не выявил существенных отличий от нормы ни в одной из возрастных подгрупп. Однако отмечено увеличение NKT-клеток с возрастом и тенденция к увеличению NK и снижению DN вне зависимости от периода заболевания.

При ГМ, так же как и в целом по группе, у детей разного возраста выявлено в остром периоде снижение Т-клеток, Th и увеличение содержания В-клеток по сравнению с возрастными показателями из литературных данных, с практической нормализацией к периоду реконвалесценции, а в возрастных группах 3–12 месяца, 1–2 года, 2–5 лет отмечено незначительное снижение NK-клеток по сравнению с литературной нормой как в остром периоде, так и в период реконвалесценции. При ГМ обнаружена тенденция к увеличению с возрастом относительного содержания Т-клеток, CTL, NK и большинства малых субпопуляций и снижению относительного содержания В-лимфоцитов.

При исследовании субпопуляционного состава лимфоцитов ЦСЖ выявлены отклонения от показателей группы сравнения, как при СМ, так и при ГМ (табл. 2). У больных СМ в остром периоде обнаружено увеличение содержания $CD4^+$ Th, NK и DN Т-клеток, снижение CTL и ее фенотипов ($CD3^+CD8^{dim}$, $CD3^+CD8^{bright}$), NKT и DP Т-клеток. Коэффициент Th/CTL в острый период СМ в ЦСЖ был почти в 2 раза выше аналогичного показателя у детей с ОРВИ. В динамике заболевания наблюдалось достоверное снижение $CD4^+$ Th, увеличение CTL, $CD3^+CD8^{dim}$, $CD3^+CD8^{bright}$, DP Т-клеток и В-лимфоцитов, нормализация соотношения

Th/CTL. Однако содержание малых субпопуляций в ликворе (DP и DN T-клеток, NKT, CD3⁻CD8⁺ NK) достоверно отличалось от группы сравнения и в период реконвалесценции.

При ГМ в остром периоде заболевания в ЦСЖ выявлено существенное снижение CD3⁺ T-клеток, Th, CTL и ее субпопуляций, NKT и DP T-лимфоцитов при значительно большем количестве В-клеток, NK, CD3⁻CD8⁺ NK и DN T-лимфоцитов (табл. 2). Коэффициент Th/CTL был сопоставим с показателем детей с ОРВИ. В динамике заболевания обнаружено достоверное увеличение CD3⁺ T-клеток, CTL, CD3⁺CD8^{bright} T-клеток и снижение В-лимфоцитов по сравнению с острым периодом, однако содержание большинства субпопуляций оставалось отличным от этого же показателя в группе сравнения. Коэффициент Th/CTL в динамике ГМ достоверно снижался, при этом оставаясь сопоставимым с условным контролем.

Проведено также сопоставление субпопуляционного состава лимфоцитов ЦСЖ детей разных возрастных групп, переносящих СМ и ГМ, с соответствующими показателями группы сравнения (2–5 лет, 6–11 лет и 12–18 лет), полученными нами ранее [4]. При СМ у детей разного возраста в сравнении с возрастной «нормой» выявлены те же закономерности, что и в целом по группе. При этом отмечено увеличение с возрастом Th и коэффициента Th/CTL и снижение содержания DN, аналогично группе сравнения. Уровень NK не отличался в разных возрастных группах, в то время как наблюдалось снижение уровня этих клеток с возрастом в группе сравнения [4].

При ГМ в связи с отсутствием в группе сравнения детей раннего возраста (3–12 месяцев, 1–2 лет) показатели субпопуляционного состава лимфоцитов ЦСЖ сравнивались с «нормой» только у детей 2–5 и 6–11 лет. В возрастных

Таблица 1. Относительное (%) содержание основных и малых субпопуляций лимфоцитов крови при менингитах и острой респираторной вирусной инфекции у детей

Table 1. Percentage (%) of major and minor blood lymphocyte subsets in children with meningitis and acute respiratory viral infection (the comparison group)

Субпопуляции лимфоцитов, % Lymphocyte subsets, %	Содержание (%), Ме [Q ₂₅ –Q ₇₅] Percentage, Me [Q ₂₅ –Q ₇₅]				
	Группа сравнения (ОРВИ) The comparison group (ARVI) (n = 9)	Серозный менингит Aseptic meningitis		Бактериальный гнойный менингит Bacterial purulent meningitis	
		Острый период Acute period (n = 62)	Фаза реконвалесценции Recovery period (n = 44)	Острый период Acute period (n = 24)	Фаза реконвалесценции Recovery period (n = 26)
T-cells CD3 ⁺ CD45 ⁺	72,6 [68,6–80,9]	68,8 [59,7–74,1]	71,1 [67,6–74,8]**	50,7 [43,7–61,9]*,***	70,9 [62,7–76,9]**
Th CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45 ⁺	45,7 [37,9–54,4]	35,5 [31,9–42,2]*	39,3 [34,8–43,8]**	30,9 [25,4–37,7]*,***	41,4 [34,7–48,0]**
CTL CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45 ⁺	22,3 [21,5–24,1]	24,4 [20,7–28,1]	26,2 [21,5–28,5]	16,0 [11,7–23,2]**	23,1 [17,2–28,5]**
NK CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD45 ⁺	6,0 [2,4–9,9]	9,1 [5,4–15,4]*	10,1 [6,1–12,7]*	3,2 [1,8–5,4]**	3,5 [1,4–5,7]**
B-cells CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD45 ⁺	16,9 [13,2–19,8]	20,1 [16,0–22,8]	16,0 [13,8–19,3]**	43,8 [29,1–52,4]*,***	21,5 [15,2–33,0]**,***
CD45⁺CD3⁻CD8⁺ NK	2,5 [0,8–3,5]	2,8 [2,0–6,5]	3,6 [2,1–5,8]	1,4 [0,8–1,9]**	1,3 [0,9–2,7]**
CD45⁺CD3⁺CD16⁺CD56⁺ NKT	0,9 [0,4–2,2]	2,5 [1,7–3,5]*	2,2 [1,4–3,2]*	0,4 [0,2–1,4]**	0,8 [0,3–2,3]**
CD45⁺CD3⁻CD4⁻CD8⁻ DN	3,5 [2,5–5,7]	4,6 [3,5–6,6]	4,8 [3,6–6,5]	2,1 [1,3–4,6]**	3,0 [1,8–5,1]**
CD45⁺CD3⁺CD4⁺CD8⁺ DP	0,6 [0,5–1,4]	0,6 [0,5–0,9]	0,6 [0,5–0,9]	0,5 [0,3–0,8]	0,8 [0,6–1,2]**
CD45⁺CD3⁺CD8^{bright}	20,5 [19,2–22,2]	21,4 [18,0–25,0]	22,5 [18,2–24,8]	15,0 [10,5–22,0]**	20,7 [16,2–27,0]**
CD45⁺CD3⁺CD8^{dim}	3,0 [2,1–3,7]	3,8 [3,0–5,3]	3,9 [3,0–5,1]*	1,6 [1,1–2,3]*,***	2,3 [1,9–3,5]**
Th/CTL	2,1 [1,8–2,5]	1,5 [1,2–1,9]*	1,6 [1,2–1,9]*	2,0 [1,3–2,7]	1,7 [1,4–2,5]

Примечания. * — отличие от группы сравнения, ** — отличие показателей периода реконвалесценции от показателей острого периода, *** — отличие показателей при бактериальном гнойном менингите от показателей при серозном менингите.

Notes. * — significant difference from the comparison group, ** — significant difference between the recovery period and the acute period, *** — significant difference between bacterial purulent and aseptic meningitis.

подгруппах обнаружены те же закономерности в изменениях субпопуляционного состава лимфоцитов ликвора, как и в целом по группе больных ГМ. Отмечено увеличение с возрастом в ликворе содержания Т-клеток, Th и существенное снижение содержания В-лимфоцитов в старших возрастных подгруппах (особенно в возрасте 6–11 лет), характерное для всех периодов заболевания.

Таким образом, рассмотрение динамики субпопуляционного состава лимфоцитов крови и ЦСЖ в целом по группам детей, переносящих СМ и ГМ, и в подгруппах детей разного возраста выявило общие закономерности, что позволило в дальнейшем сопоставить основные группы пациентов между собой без разграничения по возрасту.

При сопоставлении относительного содержания основных и малых субпопуляций лимфо-

цитов крови и ликвора в остром периоде при СМ и ГМ выявлены существенные различия. Так, в крови больных СМ преобладали Т-клетки, Th, CTL, NK NKT, DN Т-лимфоциты, CD3⁺CD8⁺ NK, CD3⁺CD8^{bright} и CD3⁺CD8^{dim} Т-клеток при существенном снижении количества В-клеток по сравнению с ГМ (табл. 1). В ЦСЖ детей с СМ доля Т-клеток и Th превалировала, а доля В-клеток CD3⁺CD8⁺ NK была очень мала в сравнении с показателями при ГМ (табл. 2).

Для выявления особенностей интраклеточного и системного клеточного иммунного ответа проведены расчеты коэффициентов «ЦСЖ/кровь» для исследованных субпопуляций лимфоцитов у детей с менингитами и ОРВИ (табл. 3). В группе сравнения установлено превалирование в ЦСЖ большинства субпопуляций (коэффициенты варьировали от 1,2 до 16,4), за исключением В-клеток, NK

Таблица 2. Относительное (%) содержание основных и малых субпопуляций лимфоцитов цереброспинальной жидкости при менингитах и острой респираторной вирусной инфекции у детей
Table 2. Percentage (%) of major and minor lymphocyte subsets in cerebrospinal fluid in children with meningitis and acute respiratory viral infection (the comparison group)

Субпопуляции лимфоцитов, % Lymphocyte subsets, %	Содержание (%), Ме [Q ₂₅ –Q ₇₅] Percentage, Me [Q ₂₅ –Q ₇₅]				
	Группа сравнения (ОРВИ) The comparison group (ARVI) (n = 28)	Серозный менингит Aseptic meningitis		Бактериальный гнойный менингит Bacterial purulent meningitis	
		Острый период Acute period (n = 82)	Фаза реконвалесценции Recovery period (n = 41)	Острый период Acute period (n = 32)	Фаза реконвалесценции Recovery period (n = 28)
T-cells CD3 ⁺ CD45 ⁺	95,9 [93,0–97,4]	95,7 [93,4–96,9]	94,8 [91,3–96,7]	79,5 [72,2–86,5]*, ***,	88,4 [83,7–93,8]*, **, ***,
Th CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45 ⁺	53,5 [47,5–61,5]	66,9 [59,6–71,3]*	53,5 [42,6–65,9]**	49,0 [31,3–54,7]*, ***,	51,1 [39,5–57,7]
CTL CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45 ⁺	27,9 [19,8–34,8]	17,1 [13,8–22,5]*	25,3 [19,2–29,7]**	19,0 [13,7–23,2]*	26,8 [20,7–31,7]**
NK CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD45 ⁺	2,1 [1,0–3,1]	3,3 [1,7–5,2]*	2,7 [1,7–4,7]	3,6 [2,1–7,4]*	3,8 [1,9–7,4]*
B-cells CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD45 ⁺	0,8 [0,3–1,8]	0,4 [0,2–1,2]	1,2 [0,6–3,1]**	12,8 [7,1–19,6]*, ***,	4,2 [1,7–6,8]*, **, ***,
CD45⁺CD3⁺CD8⁺ NK	0,3 [0,0–1,2]	0,6 [0,3–1,0]	0,7 [0,4–1,2]*	0,8 [0,6–1,4]*, ***,	0,9 [0,6–1,9]*
CD45⁺CD3⁺CD16⁺CD56⁺ NKT	10,1 [6,0–16,8]	4,1 [2,1–8,9]*	4,5 [2,4–8,7]*	3,7 [1,7–5,7]*	3,5 [1,9–6,6]*
CD45⁺CD3⁺CD4⁺CD8⁺ DN	5,4 [2,5–8,6]	7,2 [5,3–11,6]*	7,5 [5,0–12,9]*	7,4 [4,2–11,0]	8,0 [5,5–10,0]*
CD45⁺CD3⁺CD4⁺CD8⁺ DP	4,2 [2,8–7,8]	1,2 [0,8–1,9]*	2,2 [1,3–3,9]*, **	1,6 [0,8–2,4]*	1,8 [1,2–2,9]*
CD45⁺CD3⁺CD8^{bright}	23,7 [16,2–32,7]	13,3 [11,1–18,8]*	20,5 [14,0–26,1]**	14,7 [11,6–22,3]*	24,4 [16,4–29,2]**
CD45⁺CD3⁺CD8^{dim}	8,1 [5,2–12,8]	4,1 [3,4–6,0]*	5,8 [4,2–8,3]**	4,8 [3,0–6,4]*	5,0 [3,9–6,0]*
Th/CTL	2,1 [1,8–2,5]	4,1 [2,5–4,9]*	2,0 [1,4–3,0]**	2,6 [1,5–3,4]	2,0 [1,2–2,4]**

Примечания. * — отличие от группы сравнения, ** — отличие показателей периода реконвалесценции от показателей острого периода, *** — отличие показателей при бактериальном гнойном менингите от показателей при серозном менингите.

Notes. * — significant difference with the comparison group, ** — significant difference between the recovery phase and the acute period, *** — significant difference between bacterial purulent and aseptic meningitis.

и CD3⁻CD8⁺NK, количество которых в ЦСЖ было снижено по сравнению с кровью (коэффициенты варьировали от 0,07 до 0,31). При СМ в отличие от группы сравнения в остром периоде коэффициент «ЦСЖ/кровь» был выше для Th и DN T-лимфоцитов, ниже для CTL, NKT, CD3⁺CD8^{bright}, CD3⁺CD8^{dim} (табл. 3). При этом CTL- и CD3⁺CD8^{dim}-клеток в ЦСЖ становится меньше, чем в кровотоке. В период реконвалесценции СМ в сравнении с острым периодом происходят значительные изменения в распределении субпопуляций в биологических жидкостях: коэффициент «ЦСЖ/кровь» снижается для T-клеток, Th и увеличивается для CTL, B-клеток, DP T-клеток, CD3⁺CD8^{bright} и CD3⁺CD8^{dim}. Однако, несмотря на явную тенденцию к «нормализации», коэффициент «ЦСЖ/кровь» для NKT, DP и CD3⁺CD8^{dim} T-клеток остается сниженным в сравнении с показателями при ОРВИ.

При ГМ соотношение основных и малых субпопуляций лимфоцитов в ЦСЖ и крови было заметно иным, чем при СМ и ОРВИ (табл. 3). Так, в ЦСЖ детей в остром периоде ГМ значительно увеличивался коэффициент для NK (в 9,7 раз по сравнению с ОРВИ, в 5,8 раз по сравнению с СМ) и CD19⁺ B-клеток (в 4,9 раз по сравнению с ОРВИ, в 17 раз по сравнению с СМ). Соотношение «ЦСЖ/кровь» для CTL было сопоставимо с показателем при ОРВИ и значительно выше, чем в острый период СМ (коэффициент 1,26 при ГМ против 0,73 при СМ). К периоду ранней реконвалесценции коэффициенты «ЦСЖ/кровь» приближались к показателям группы сравнения только для T-клеточного звена, в то время как для NK и CD19⁺ B-клеток коэффициент оставался выше, а для большинства малых субпопуляций ниже. Следует отметить существенные различия в соотношении субпопуляций в ЦСЖ

Таблица 3. Соотношение содержания основных и малых субпопуляций лимфоцитов цереброспинальной жидкости и крови при менингитах и острой респираторной вирусной инфекции у детей

Table 3. Ratio of major and minor subsets of lymphocytes in cerebrospinal fluid and blood in children with meningitis and acute respiratory viral infection (the comparison group)

Субпопуляции лимфоцитов Subsets of lymphocytes	Коэффициент «ЦСЖ/кровь», Me [Q ₂₅ -Q ₇₅]				CSF/blood ratio, Me [Q ₂₅ -Q ₇₅]	
	Группа сравнения (ОРВИ) The comparison group (ARVI) (n = 9)	Серозный менингит Aseptic meningitis		Бактериальный гнойный менингит Bacterial purulent meningitis		
		Острый период Acute period (n = 59)	Фаза реконвалесценции Recovery period (n = 35)	Острый период Acute period (n = 20)	Фаза реконвалесценции Recovery period (n = 26)	
T-cells CD3 ⁺ CD45 ⁺	1,29 [1,18-1,41]	1,39 [1,28-1,55]	1,30 [1,23-1,41]**	1,55 [1,26-1,73]	1,23 [1,17-1,39]**	
Th CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45 ⁺	1,38 [1,00-1,60]	1,75 [1,49-2,13]*	1,36 [1,05-1,66]**	1,50 [1,14-1,95]***	1,17 [0,90-1,43]**	
CTL CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45 ⁺	1,20 [0,76-1,49]	0,73 [0,55-0,87]*	1,03 [0,73-1,16]**	1,26 [0,84-1,77]***	1,18 [0,86-1,60]***	
NK CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD45 ⁺	0,21 [0,15-0,92]	0,35 [0,18-0,69]	0,34 [0,17-0,56]	2,04 [0,79-3,57]*, ***	0,83 [0,39-4,02]*, ***	
B-cells CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD45 ⁺	0,07 [0,02-0,23]	0,02 [0,01-0,06]	0,07 [0,04-0,21]**	0,34 [0,13-0,48]*, ***	0,19 [0,07-0,34]***	
CD45⁺CD3⁻CD8⁺ NK	0,31 [0,10-2,29]	0,19 [0,10-0,40]	0,17 [0,10-0,43]	0,85 [0,34-1,35]***	0,81 [0,25-1,57]***	
CD45⁺CD3⁺CD16⁺CD56⁺ NKT	16,36 [3,55-39,72]	2,13 [0,72-4,19]*	1,91 [0,84-6,42]*	7,44 [2,07-32,69]***	5,08 [1,80-9,88]***	
CD45⁺CD3⁺CD4⁻CD8⁻ DN	1,17 [0,73-1,62]	1,73 [1,13-2,60]*	1,44 [1,05-2,60]	3,64 [2,37-7,17]*, ***	2,94 [1,42-5,05]*, ***	
CD45⁺CD3⁺CD4⁺CD8⁺ DP	7,19 [5,71-18,40]	1,94 [1,18-2,89]*	3,98 [2,15-6,26]*, **	3,19 [2,22-4,09]*, ***	1,91 [1,33-3,60]*, ***	
CD45⁺CD3⁺CD8^{bright}	1,16 [0,80-1,50]	0,65 [0,51-0,86]*	1,00 [0,70-1,25]**	1,20 [0,75-1,72]***	1,07 [0,85-1,52]	
CD45⁺CD3⁺CD8^{dim}	2,72 [1,87-4,00]	1,12 [0,73-1,77]*	1,43 [1,12-1,74]*, **	3,24 [2,50-5,58]***	2,02 [1,47-3,79]**, ***	

Примечания. * — отличие от группы сравнения, ** — отличие показателей периода реконвалесценции от показателей острого периода, *** — отличие показателей при бактериальном гнойном менингите от показателей при серозном менингите.

Notes. * — significant difference from the comparison group, ** — significant difference between the recovery phase and the acute period, *** — significant difference between of bacterial purulent and aseptic meningitis.

и крови при СМ и ГМ в разные периоды заболевания. Полученные данные свидетельствуют о значимых различиях в содержании как основных, так и малых субпопуляций лимфоцитов крови и ЦСЖ при серозном и гнойном менингите у детей.

Обсуждение

Использование в клинической лабораторной диагностике современного высокочувствительного метода проточной цитометрии существенно расширило возможности получения новых данных об иммунопатогенезе инфекционных заболеваний. Вирусные и, особенно, бактериальные менингиты представляют актуальную проблему в связи с тяжелым течением и формированием резидуальных неврологических последствий. В предыдущем исследовании авторами установлены существенные различия уровня основных популяций лимфоцитов крови и ликвора при СМ и ГМ [2]. В настоящем исследовании с применением дополнительного алгоритма гейтирования на основе имеющейся стандартной панели антител проведена оценка пропорций и динамики основных ($CD3^+$ Т-клеток, $CD3^+CD4^+$ Th, $CD3^+CD8^+$ CTL, $CD3^-CD19^+$ В-клеток, $CD3^-CD16^+CD56^+$ NK) и малых субпопуляций лимфоцитов крови и ликвора (NKT, DN, DP, $CD3^+CD8^{bright}$, $CD3^+CD8^{dim}$, $CD3^-CD8^+$ NK) у детей с СМ и ГМ.

В связи с невозможностью получения образцов ликвора здоровых детей в качестве группы сравнения использованы результаты исследования ликвора 28 детей, переносящих ОРВИ с менингеальными симптомами (без менингита) [4] и 9 образцов крови, полученных в сроки, близкие к люмбальной пункции (с разницей не более 1 дня). Результаты исследования субпопуляций крови при СМ и ГМ в зависимости от возраста сравнивались с литературными данными [33].

Полученные данные позволили охарактеризовать соотношение основных и малых субпопуляций лимфоцитов в крови и ЦСЖ в острую фазу вирусной инфекции без воспалительного процесса в ЦНС. Обнаружено значительно более высокое относительное содержание в ликворе (по сравнению с кровью) лимфоцитов основных субпопуляций — $CD3^+$ Т-клеток и $CD4^+$ Th, а среди малых субпопуляций — NKT и DP Т-клеток, а также $CD3^+CD8^{dim}$ CTL, что можно объяснить экстренной миграцией этих клеток из кровотока в рамках механизма защиты ЦНС от вирусной экспансии. По-видимому, значительный прирост клеток этих субпопуляций в ЦСЖ характеризует эффективный иммунный ответ при системной вирусной инфекции, предотвращающий вовлечение в процесс ЦНС.

В таком случае более слабое перераспределение клеток данных субпопуляций у детей с менингитом может отражать недостаточность этого звена иммунной защиты, способствующую проникновению и репликации патогена в ЦНС.

Субпопуляции NKT, DP и DN Т-лимфоцитов известны сравнительно давно [6], но в последние десятилетия интерес к NKT и DP Т-клеткам возрос в связи с изучением их роли в патогенезе хронических воспалительных, аутоиммунных и онкологических заболеваний человека. Среди малых субпопуляций NKT-клетки являются на сегодняшний день наиболее изученными [1, 5, 23, 26, 30, 31, 32, 37]. Установлена их способность активировать созревание моноцитов в ответ на воздействие антигена [18]. Активированные NKT продуцируют большие количества цитокинов: $IFN\gamma$, IL-4, IL-10, IL-13, IL-17, IL-22, TNF- α , которые модулируют активность $CD4^+$ Т-лимфоцитов, NK и В-клеток [23, 25, 26, 30, 31, 32]. С помощью своего Т-клеточного рецептора NKT-клетки прямо распознают необычные гликолипиды, которые присутствуют на поверхности ряда бактерий. Но даже в отсутствие микробных гликолипидов NKT-клетки могут активироваться под воздействием цитокинов, секретлируемых дендритными клетками (ДК), которые первыми реагируют на патоген через свои Toll-подобные рецепторы. Это не прямое узнавание позволяет NKT-клеткам реагировать на широкий спектр возбудителей инфекций [36]. Показана их важная роль в иммунной защите от ряда бактерий, включая нейротропные *B. burgdorferi* и *S. pneumoniae* [29] (возбудитель пневмококкового менингита) [37]. NKT также вносят существенный вклад и в противовирусный иммунный ответ, хотя соответствующие липидные антигены еще не определены [14, 29].

В крови здоровых доноров число NKT колеблется от 0,5 до 6,0% [6]. В настоящей работе установлено максимальное содержание NKT в системном кровотоке в острой фазе СМ (2,5%), тогда как минимальное — в острой фазе ГМ (0,4%), что, возможно, свидетельствует об исходной недостаточности NKT-клеток у пациентов этой группы. Интересно отметить, что такие же различия мы обнаружили в отношении NK, с их максимальным уровнем в острой фазе СМ (9,1%) и минимальным в том же периоде ГМ (3,2%). Снижение относительного содержания NKT и NK в крови больных ГМ наблюдали также И.П. Балмасова и соавт., изучившие фенотипический состав лимфоцитов у взрослых пациентов с ГМ [3]. Можно предположить, что эти две субпопуляции клеток врожденного иммунитета действуют синхронно, осуществляя экстренную защиту от инфекционного агента за счет продукции «раннего» $IFN\gamma$ [7]. В ЦСЖ относительное количество NK

и НКТ в остром периоде ГМ было близко к таковому при СМ, однако число НК было достоверно выше (3,6% против 2,1%), а НКТ — гораздо ниже, чем у детей с ОРВИ (табл. 2). По данным И.П. Балмасовой и соавт. [3], в ликворе взрослых пациентов с ГМ и СМ показатели (%) НКТ (но не НК) также не различались, но проявлялась ассоциация повышенного содержания НКТ с осложненным течением ГМ.

Отчасти сходные тенденции мы наблюдали в отношении субпопуляции НК $CD3^-CD8^+$, доля которых в крови была при ГМ заметно ниже, чем при СМ (1,4% против 2,8%, $p = 0,1$), но в ЦСЖ более очевидно, чем при СМ, превышала уровень контроля в обе фазы ГМ (табл. 2).

Данные литературы касательно различных субпопуляций лимфоцитов, экспрессирующих $CD8$, единичны. Так, J. Campbell и соавт. провели исследование разных $CD8^+$ субпопуляций лимфоцитов в крови здоровых молодых мужчин, подвергшихся интенсивным физическим нагрузкам [10]. С помощью метода проточной цитометрии авторы обнаружили, что в покое часть всех $CD8^+$ лимфоцитов крови ($25 \pm 17\%$) $CD3^-$ негативны, и представляют собой отдельную субпопуляцию $CD3^-CD8^{dim}CD16^+CD56^+$ НК. Был установлен значительный рост в крови относительного содержания $CD3^-CD8^+$ НК сразу после физических упражнений, в то время как содержание $CD3^+CD8^{bright}$ и $CD3^+CD8^{dim}$ Т-клеток не изменялось. Авторами не было выявлено существенных изменений содержания $CD3^-CD8^+$ НК в крови пациентов с СМ ни в острой фазе, ни в динамике заболевания. Однако у детей с ГМ в оба периода болезни отмечено снижение числа $CD3^-CD8^+$ НК в крови при заметном росте их числа в ликворе (относительно показателей при ОРВИ).

Показано, что в крови здоровых доноров субпопуляция $CD3^+CD8^{low}$ клеток составляет 0,2–7% от числа всех $CD3^+CD8^+$ Т-клеток [34]. Установлено накопление $CD3^+CD8^{low}$ Т-клеток в крови больных хроническим вирусным гепатитом В, при этом они отличались от таких же клеток в контроле более низкой экспрессией $IFN\gamma$ и более высокой — иммуносупрессивного цитокина $TGF-\beta$ [27]. У детей, перинатально инфицированных HIV-1, в циркуляции преобладали $CD8^{low}$ Т-клетки, которые *in vitro* слабо продуцировали $IFN\gamma$ в ответ на стимуляцию антигеном CMV (cytomegalovirus) [20]. В исследовании, проведенном в острой стадии ВИЧ (HIV)-инфекции у взрослых, был выявлен рост в крови субпопуляции $CD3^+CD8^{dim}$ Т-лимфоцитов, существенная часть которых были HIV-специфическими [13]. Данная субпопуляция в сравнении с $CD3^+CD8^{bright}$ Т-лимфоцитами характеризовалась низким потенциалом ингибирования репликации ви-

руса. Рост этой субпопуляции прямо коррелировал с вирусной нагрузкой и клиническими предикторами быстрого прогрессирования HIV-инфекции. Авторы связывают неэффективность ответа $CD8^+$ CTL при HIV-инфекции с ранней экспансией функционально неполноценных $CD3^+CD8^{dim}$ HIV-специфических Т-клеток. В нашем исследовании мы отметили заметный рост в циркуляции малой субпопуляции $CD3^+CD8^{dim}$ Т-лимфоцитов у детей с СМ (в обе стадии болезни), но не с ГМ.

Помимо НКТ-клеток в ликворе в острую фазу СМ и ГМ обнаружено сниженное (по сравнению с уровнем при ОРВИ) относительное содержание и других субпопуляций, обладающих цитотоксическим потенциалом (DP , $CD3^+CD8^{dim}$ и $CD3^+CD8^{bright}$), что соответствует более выраженному, чем при ОРВИ, перераспределению основных субпопуляций Т-лимфоцитов, с преимущественным накоплением в ЦСЖ $CD4^+$ Th, а при ГМ еще и $CD19^+$ В-клеток (табл. 1).

DP $CD4^+CD8^+$ Т-лимфоциты обнаружены в крови здоровых лиц, где они составляют 1–3% от общего числа Т-клеток. Показано, что $CD4^+CD8^+$ Т-клетки являются антиген-специфическими клетками памяти с функциями как $CD4^+$, так и $CD8^+$ Т-клеток: продуцируют цитокины Th1-типа и обладают цитотоксичностью на уровне $CD8^+$ CTL [5, 6]. Рост этой малой субпопуляции Т-клеток обнаружен при хронических вирусных инфекциях (EBV, HIV), некоторых аутоиммунных, аллергических и онкологических заболеваниях. Обнаружена значительная гетерогенность DP Т-клеток, выполняющих различные функции в зависимости от транскрипционных факторов, уровня экспрессии $CD4$ и $CD8$, возраста и настроек иммунной системы при разных болезнях [28]. Установлено активное участие субпопуляции DP Т-клеток в патогенезе острой HIV-инфекции, при которой DP Т-клетки высоко реагировали на стимуляцию HIV *in vitro*, независимо от основных субпопуляций антиген-специфических Т-клеток [15].

В противоположность субпопуляциям НКТ и DP Т-клеток у пациентов с СМ происходил рост (по сравнению с ОРВИ) относительного содержания DN Т-клеток и $CD3^-CD8^+$ НК как в крови, так и в ЦСЖ, что могло отражать их дополнительную мобилизацию. В остром периоде ГМ количество этих клеток в крови было сниженным, хотя в ликворе было заметно их накопление.

DN Т-лимфоциты изучены гораздо меньше, чем DP , но уже сейчас ясно, что эти клетки также являются важными участниками противовирусного или аутоиммунного ответа. Определен, например, высокий уровень транскрипции HIV в DN Т-клетках нелеченых пациентов с HIV-инфекцией, с исчезновением РНК вируса из этих

клеток после курса ретровирусной терапии [19]. Это позволило авторам предположить, что в продуктивном периоде HIV-инфекции DN Т-лимфоциты являются главным резервуаром вируса и могут происходить из инфицированных CD4⁺ Т-клеток из-за снижения экспрессии ими CD4. Однако в условиях аутоиммунного пролиферативного синдрома циркулирующие в крови DN Т-клетки, очевидно, происходят из клона CD8⁺ Т-клеток с утратой ими корцептора CD8 [9]. Ряд данных позволяет обозначить потенциально патогенную роль DN Т-клеток в аутоиммунной патологии и, напротив, гомеостатическую роль этих клеток в супрессии избыточного адаптивного Т-клеточного ответа с ослаблением его повреждающего действия [11]. R. Ahmed и соавт. [2014] установили, что число DN Т-лимфоцитов растет вскоре после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток, причем в DN клетках определен набор экспрессии генов (включая ген IL-8), отличный от набора в CD4⁺ или CD8⁺ Т-лимфоцитах. Показано участие DN Т-клеток в иммунитете против вирусной инфекции, вызванной вирусом Эпштейна–Барр (EBV), в качестве антиген-специфической эффекторной Т-клеточной субпопуляции [8]. В условиях аллотрансплантации органов DN Т-лимфоциты выполняют функции регуляторных Т-клеток (Treg) наряду с другими типами Treg, продлевая жизнь трансплантата через индукцию апоптоза, прямой лизис эффекторных Т-клеток или секрецию иммуносупрессивных цитокинов TGF- β и IL-10 [24]. Обнаруженный авторами в ЦСЖ больных СМ и ГМ (острый период) рост содержания DN Т-клеток, возможно, отражает механизм регуляции рекрутированных в ЦНС клеток адаптивного иммунного ответа.

К периоду реконвалесценции содержание малых субпопуляций лимфоцитов при СМ возросло за счет клеток с цитотоксической активностью (DP, CD3⁺CD8^{dim} и CD3⁺CD8^{bright}), а при ГМ — за счет CD3⁺CD8^{bright} CTL. Хорошо известно, что системная генерация антиген-специфических CD8⁺ CTL требует значительно большего времени, чем CD4⁺ Th [6]. С другой стороны, такая динамика интрацеребрального состава лимфоцитов может отражать общие особенности иммунопатогенеза нейроинфекций, где в острый период заболевания в ЦНС доминирует регуляторное звено адаптивного иммунного ответа, с чем согласуется 2–3-кратное преобладание в ЦСЖ пациентов с СМ или ГМ основной субпопуляции CD4⁺ Th над CD8⁺ CTL. Доминирование в ЦСЖ субпопуляции CD4⁺ Th над CD8⁺ CTL неоднократно наблюдали при отсутствии патологии в ЦНС и многих неврологических заболеваниях (включая вирусные и бактериальные менингиты). По-видимому, CD4⁺ Т-лимфоциты обладают повышенной способ-

ностью преодолевать гематоэнцефалический барьер, что важно для поддержания гомеостаза иммунной системы мозга в физиологических условиях и при патологии ЦНС [17, 22].

Данные о преобладании в ЦСЖ детей с СМ и ГМ цитокин-продуцирующих CD4⁺ Т-клеток дополняют результаты предыдущего исследования [2], в котором показан значительный рост концентраций IL-6 в ЦСЖ (по сравнению с кровью) у детей обеих групп, а также IL-4 (при СМ) или IL-10 (при ГМ) — цитокинов с противовоспалительными свойствами, характерных для CD4⁺ Th2 и CD4⁺ Treg соответственно.

Обобщая все изученные параметры, можно констатировать, что в остром периоде СМ и ГМ относительное содержание CD3⁺, CD4⁺ Т-лимфоцитов, а также клеток малых субпопуляций (NKT, DP и DN Т-клеток, а при ГМ и CD3⁺CD8^{dim} Т-клеток) значительно выше в ЦСЖ, чем в крови, что может свидетельствовать об участии этих субпопуляций в механизмах локальной иммунной защиты при менингитах у детей. Дифференциально-диагностическими признаками первой иммунограммы крови пациентов с ГМ (в сравнении с СМ и ОРВИ) может быть ряд следующих показателей: низкое относительное содержание CD3⁺, CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов при двукратном росте числа CD19⁺ В-лимфоцитов, а также дефицит NK и большинства малых субпопуляций лимфоцитов — NKT, CD8⁺ NK, DN-Т-клеток, CD3⁺CD8^{dim} и CD3⁺CD8^{bright} CTL.

Заключение

При помощи метода проточной цитометрии с использованием дополнительного алгоритма гейтирования субпопуляций лимфоцитов охарактеризован состав основных и малых субпопуляций лимфоцитов (NKT, CD3⁺CD8⁺ NK, DP и DN, CD3⁺CD8^{dim} и CD3⁺CD8^{bright} Т-клеток) крови и ликвора у детей группы сравнения (ОРВИ), и детей, переносящих ГМ и СМ. Выявлены значимые различия между их содержанием в крови и ЦСЖ, что позволяет оценить взаимосвязь клеточного компонента системного и локального иммунного ответа и предположить патогенетическую роль исследованных популяций в развитии менингитов у детей. Обнаружены достоверные различия в относительном содержании основных и некоторых малых субпопуляций (NKT, CD3⁺CD8⁺ NK, DN, CD3⁺CD8^{dim} и CD3⁺CD8^{bright}) у детей с СМ и ГМ. Дальнейший поиск диагностического и прогностического значения оценки малых субпопуляций лимфоцитов в зависимости от этиологии и тяжести течения заболевания позволит уточнить иммунопатогенетические механизмы различных по этиологии инфекционных заболеваний ЦНС у детей.

Список литературы/References

1. Акинфиева О.В., Бубнова Л.Н., Бессмельцев С.С. NKT-клетки: характерные свойства и функциональная значимость для регуляции иммунного ответа // Онкогематология. 2010. Т. 5, № 4. С. 39–47. [Akinfieva O.V., Bubnova L.N., Bessmeltsev S.S. NKT cells: characteristic features and functional significance in immune response regulation. *Onkogematologiya = Oncohematology*, 2010, vol. 5, no. 4, pp. 39–47. (In Russ.)]
2. Алексеева Л.А., Железникова Г.Ф., Жирков А.А., Скрипченко Н.В., Вильниц А.А., Монахова Н.Е., Бессонова Т.В. Субпопуляции лимфоцитов и цитокины в крови и цереброспинальной жидкости при вирусных и бактериальных менингитах у детей // Инфекция и иммунитет. 2016. Т. 6, № 1. С. 33–44. [Alekseeva L.A., Zheleznikova G.F., Zhirkov A.A., Skripchenko N.V., Vilnits A.A., Monakhova N.E., Bessonova T.V. Lymphocyte subsets and cytokines in blood and cerebrospinal fluid in children with viral and bacterial meningitis. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2016, vol. 6, no. 1, pp. 33–44. (In Russ.)] doi: 0.15789/2220-7619-2016-1-33-44
3. Балмасова И.П., Венгеров Ю.Я., Раздобарина С.Е., Нагибина М.В. Иммунопатогенетические особенности бактериальных гнойных менингитов // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2014. Т. 19, № 5. С. 17–22. [Balmasova I.P., Vengerov Yu.Ya., Razdobarina S.E., Nagibina M.V. Immunopathogenetic features of bacterial purulent meningitides. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases*, 2014, vol. 19, no. 5, pp. 17–22. (In Russ.)]
4. Жирков А.А., Алексеева Л.А., Железникова Г.Ф., Монахова Н.Е., Бессонова Т.В. Субпопуляционный состав лимфоцитов цереброспинальной жидкости детей с острой респираторной вирусной инфекцией, протекающей с синдромом менингизма // Медицинская иммунология. 2019. Т. 21, № 6. С. 1033–1042. [Zhirkov A.A., Alekseeva L.A., Zheleznikova G.F., Monakhova N.E., Bessonova T.V. Subsets of cerebrospinal fluid lymphocytes in acute pediatric respiratory viral infection with meningeal syndrome. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, vol. 21, no. 6, pp. 1033–1042. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1033-1042
5. Хайдуков С.В. Малые субпопуляции Т-хелперов (Th наивные тимические, Th наивные центральные, Th9, Th22 и CD4⁺CD8⁺ дважды положительные Т-клетки) // Медицинская иммунология. 2013. Т. 15, № 6. С. 503–512. [Khaidukov S.V. Minor subsets of T-helpers (Th thymic naive, Th central naive, Th9, Th22 and CD4⁺CD8⁺ double positive T-cells. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2013, vol. 15, no. 6, pp. 503–512. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2013-6-503-512
6. Хайдуков С.В., Байдун Л.В. Современные подходы к оценке клеточной составляющей иммунного статуса // Медицинский алфавит. 2015. Т. 2, № 8. С. 44–51. [Khaidukov S.V., Baydun L.V. Modern approach to assessing cellular constituents immune status. *Medicinskij alfavit = Medical Alphabet*, 2015, vol. 2, no. 8, pp. 44–51. (In Russ.)]
7. Ярилин А.А. Иммунология. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с. [Yarilin A.A. Immunology. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 752 p. (In Russ.)]
8. Ahmed R.K., Poiret T., Ambati A., Rane L., Remberger M., Omazic B., Vudattu N.K., Winiarski J., Ernberg I., Axelsson-Robertson R., Magalhaes I., Castelli C., Ringden O., Maeurer M. TCR⁺CD4⁺CD8⁻ T cells in antigen-specific MHC class I-restricted T-cell responses after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J. Immunother.*, 2014, vol. 37, no. 8, pp. 416–425. doi: 10.1097/CJI.0000000000000047
9. Bristeau-Leprince A., Mateo V., Lim A., Magerus-Chatinet A., Solary E., Fischer A., Rieux-Laucat F., Gougeon M.-L. Human TCR α/β ⁺ CD4⁺CD8⁻ double-negative t cells in patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome express restricted V β TCR diversity and are clonally related to CD8⁺ t cells. *J. Immunol.*, 2014, vol. 181, no. 1, pp. 440–448. doi: 10.4049/jimmunol.181.1.440
10. Campbell J.P., Guy K., Cosgrove C., Florida-James G.D., Simpson R.J. Total lymphocyte CD8 expression is not a reliable marker of cytotoxic T-cell populations in human peripheral blood following an acute bout of high-intensity exercise. *Brain. Behav. Immun.*, 2008, vol. 22, no. 3, pp. 375–380. doi: 10.1016/j.bbi.2007.09.001
11. D'Acquisto F., Crompton T. CD3⁺CD4⁺CD8⁻ (double negative) T cells: saviours or villains of the immune response? *Biochem. Pharmacol.*, 2011, vol. 82, no. 4, pp. 333–340. doi: 10.1016/j.bcp.2011.05.019
12. Das G., Augustine M.M., Das J., Bottomly K., Ray P., Ray A. An important regulatory role for CD4⁺CD8 $\alpha\alpha$ T cells in the intestinal epithelial layer in the prevention of inflammatory bowel disease. *PNAS*, 2003, vol. 100, no. 9, pp. 5324–5329. doi: 10.1073/pnas.0831037100
13. Eller M.A., Goonetilleke N., Tassaneethitip B., Eller L.A., Costanzo C., Johnson S., Betts M.R., Krebs S.J., Slike B.M., Nitayaphan S., Rono K., Tovanabutra S., Maganga L., Kibuuka H., Jagodzinski L., Peel S., Rolland M., Marovich M.A., Kim J.H., Michael N.L., Robb M.L., Streeck H. Expansion of inefficient HIV-specific CD8⁺ T cells during acute infection. *J. Virol.*, 2016, vol. 90, no. 8, pp. 4005–4016. doi: 10.1128/JVI.02785-15
14. Fernandez C.S., Kelleher A.D., Finlayson R., Godfrey D.I., Kent S.J. NKT cell depletion in humans during early HIV infection. *Immunol. Cell Biol.*, 2014, vol. 92, no. 7, pp. 578–590. doi: 10.1038/icb.2014.25
15. Frahm M.A., Picking R.A., Kuruc J.D., McGee K.S., Gay C.L., Eron J.J., Hicks C.B., Tomaras G.D., Ferrari G. CD4⁺CD8⁺ T-cells represent a significant portion of the anti-HIV T-cell response to acute HIV infection. *J. Immunol.*, 2014, vol. 71, no. 11, pp. 3831–3840. doi: 10.4049/jimmunol.1103701
16. Giancchetti E., Vittorio D., Fierabracci A. NK cells in autoimmune diseases: linking innate and adaptive immune responses. *Autoimmun. Rev.*, 2018, vol. 17, no. 2, pp. 142–154. doi: 10.1016/j.autrev.2017.11.018
17. Graaf De M.T., Smitt P.A., Luitwieler R.L., Van Velzen C., Van Den Broek P.D., Kraan J., Gratama J.W. Central memory CD4⁺ T cells dominate the normal cerebrospinal fluid. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)*, 2011, vol. 80, no. 1, pp. 43–50. doi: 10.1002/cyto.b.20542
18. Hegde S., Chen X., Keaton J.M., Reddington F., Besra G.S., Gumperz J.E. NKT cells direct monocytes into a DC differentiation pathway. *J. Leukoc. Biol.*, 2007, vol. 81, no. 5, pp. 1224–1235. doi: 10.1189/jlb.1206718
19. Kaiser P., Joos B., Niederost B., Weber R., Gunthard H.F., Fischer M. Productive human immunodeficiency virus type 1 infection in peripheral blood predominantly takes place in CD4/CD8 double-negative T lymphocytes. *J. Virol.*, 2007, vol. 81, no. 18, pp. 9693–9706. doi: 10.1128/JVI.00492-07

20. Keir M.E., Rosenberg M.G., Sandberg J.K., Jordan K.A., Wiznia A., Nixon D.F., Stoddart C.A., McCune J.M. Generation of CD3⁺CD8^{low} thymocytes in the HIV type 1-infected thymus. *J. Immunol.*, 2014, vol. 169, no. 5, pp. 2788–2796. doi: 10.4049/jimmunol.169.5.2788
21. Kitchen S.G., Jones N.R., LaForge S., Whitmire J.K., Vu B.A., Galic Z., Brooks D.G., Brown S.J., Kitchen C.M., Zack J.A. CD4 on CD8⁺ T cells directly enhances effector function and is a target for HIV infection. *PNAS*, 2004, vol. 101, no. 23, pp. 8727–8732. doi: 10.1073/pnas.0401500101
22. Kowarik M.C., Grummel V., Wemlinger S., Buck D., Weber M.S., Berthele A., Hemmer B. Immune cell subtyping in the cerebrospinal fluid of patients with neurological diseases. *J. Neurol.*, 2014, vol. 261, pp. 130–143. doi: 10.1007/s00415-013-7145-2
23. Kumar V., Terry L. Different subsets of natural killer T cells may vary in their roles in health and disease. *Immunology*, 2014, vol. 142, no. 3, pp. 321–336. doi: 10.1111/imm.12247
24. Ligocki A.J., Niederkorn J.Y. Advances on non-CD4⁺Foxp3⁺ T regulatory cells: CD8⁺, type 1, and double negative T regulatory cells in organ transplantation. *Transplantation*, 2015, vol. 20, no. 2, pp. 163–178. doi: 10.1097/TP.0000000000000813
25. Lin H., Nieda M., Rozenkov V., Nicol A.J. Analysis of the effect of different NKT cell subpopulations on the activation of CD4 and CD8 T cells, NK cells, and B cells. *Exp. Hematol.*, 2006, vol. 34, no. 3, pp. 289–295. doi: 10.1016/j.exphem.2005.12.008
26. Marrero I., Ware R., Kumar V. Type II NKT cells in inflammation, autoimmunity, microbial immunity, and cancer. *Front. Immunol.*, 2015, vol. 6, pp. 1–6. doi: 10.3389/fimmu.2015.00316
27. Ouyang L., Li X., Liang Z., Yang D., Gong F. CD8^{low} T-cell subpopulation is increased in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Mol. Immunol.*, 2013, vol. 56, no. 4, pp. 698–704. doi: 10.1016/j.molimm.2013.07.003
28. Overgaard N.H., Jung J.-W., Steptoe R.J., Wells J.W. CD4⁺/CD8⁺ double-positive T cells: more than just a developmental stage? *J. Leukoc. Biol.*, 2015, vol. 97, no. 1, pp. 31–38. doi: 10.1189/jlb.1RU0814-382
29. Rhost S., Sedimbi S., Kadri N., Cardell S.L. immunomodulatory type II natural killer T Lymphocytes in health and disease. *Scand. J. Immunol.*, 2012, vol. 76, no. 3, pp. 246–255. doi: 10.1111/j.1365-3083.2012.02750.x
30. Schönrich G., Raftery M.J. CD1-restricted T cells during persistent virus infections: “sympathy for the devil”. *Front Immunol.*, 2018, vol. 9, pp. 1–16. doi: 10.3389/fimmu.2018.00545
31. Singh A.K., Tripathi P., Cardell S.L. Type II NKT cells: an elusive population with immunoregulatory properties. *Front Immunol.*, 2018, vol. 9, pp. 1–8. doi: 10.3389/fimmu.2018.01969
32. Torina A., Guggino G., Pio M., Manna L., Sireci G. The Janus face of NKT cell function in autoimmunity and infectious diseases. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, vol. 19, no. 440, pp. 1–10. doi: 10.3390/ijms19020440
33. Tosano F., Bucciol G., Pantano G., Putti M.C., Sanzari M.C., Basso G., Plebani M. Lymphocytes subsets reference value in childhood. *Cytometry Part A*, 2015, vol. 87, no. 1, pp. 81–85. doi: 10.1002/cyto.a.22520
34. Trautmann A., Ruckert B., Schmid-Grendelmeier E., Niederery P., Blaser K., Akdis C.A. Human CD8 T cells of the peripheral blood contain a low CD8 expressing cytotoxic/effector subpopulation. *Immunol.*, 2003, vol. 108, no. 3, pp. 305–312. doi: 10.1046/j.1365-2567.2003.01590.x
35. Tsunoda I., Tanaka T., Fujinami R.S. Regulatory role of CD1d in neurotropic virus infection. *J. Virol.*, 2008, vol. 82, no. 20, pp. 10279–10289. doi: 10.1128/JVI.00734-08
36. Tupin E., Kinjo Y., Kronenberg M. The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms. *Nat. Rev.*, 2007, vol. 5, no. 6, pp. 405–417. doi: 10.1038/nrmicro1657
37. Zajonc D.M., Girardi E. Recognition of microbial glycolipids by natural killer T cells. *Front. Immunol.*, 2015, vol. 6, pp. 1–11. doi: 10.3389/fimmu.2015.00400
38. Zloza A., Al-Harhi L. Multiple populations of T lymphocytes are distinguished by the level of CD4 and CD8 coexpression and require individual consideration. *J. Leukoc. Biol.*, 2006, vol. 79, no. 1, pp. 4–6. doi: 10.1189/jlb.0805455

Авторы:

Жирков А.А., младший научный сотрудник отдела клинической лабораторной диагностики, ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Алексеева Л.А., д.б.н., руководитель и ведущий научный сотрудник отдела клинической лабораторной диагностики, ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Железникова Г.Ф., д.м.н., профессор, старший научный сотрудник отдела клинической лабораторной диагностики, ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Скрипченко Н.В., д.м.н., профессор, зам. директора по научной работе ДНК ЦИБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия; зав. кафедрой инфекционных болезней ФП

и ДПО Государственного педиатрического медицинского университета Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия;

Монахова Н.Е., научный сотрудник отдела клинической лабораторной диагностики, ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Бессонова Т.В., научный сотрудник отдела клинической лабораторной диагностики, ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Zhirkov A.A., Junior Researcher, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, PRCCID, St. Petersburg, Russian Federation;

Alekseeva L.A., PhD, MD (Biology), Head and Leading Researcher of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics, PRCCID, St. Petersburg, Russian Federation;

Zheleznikova G.F., PhD, MD (Medicine), Professor, Senior Researcher, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, PRCCID, St. Petersburg, Russian Federation;

Skripchenko N.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director of Science, PRCCID, St. Petersburg, Russian Federation;

Head of the Department of Infectious Diseases of Postgraduate and Continuing Professional Education SPbSPMU of the Ministry of Health of Russia, St. Petersburg, Russian Federation;

Monakhova N.E., Researcher, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, PRCCID, St. Petersburg, Russian Federation;

Bessonova T.V., Researcher, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, PRCCID, St. Petersburg, Russian Federation.