

СУБПОПУЛЯЦИИ ЛИМФОЦИТОВ И ЦИТОКИНЫ В КРОВИ И ЦЕРЕБРОСПИНАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ ВИРУСНЫХ И БАКТЕРИАЛЬНЫХ МЕНИНГИТАХ У ДЕТЕЙ

Л.А. Алексеева, Г.Ф. Железникова, А.А. Жирков, Н.В. Скрипченко, А.А. Вильниц, Н.Е. Монахова, Т.В. Бессонова

ФГБУ НИИ детских инфекций ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Введение проточной цитометрии вызвало рост исследований фенотипического состава пула лимфоцитов цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) при различных заболеваниях мозга, включая вирусные и бактериальные менингиты, однако у детей подобные исследования проводились редко. Фенотип и функции лимфоцитов находятся под контролем системы цитокинов, поэтому большой интерес представляет выявление взаимосвязей между субпопуляционным составом пула лимфоцитов и уровнем цитокинов в крови и ЦСЖ пациентов. Целью настоящего исследования являлось изучение субпопуляционного состава лимфоцитов и уровня цитокинов IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IFN α , IFN γ и IL-4, а также IgG в ЦСЖ и крови у детей с вирусными и бактериальными менингитами. Проведено исследование крови и ЦСЖ у 46 детей в возрасте от 1 года до 16 лет с вирусными (n = 35) и бактериальными (n = 11) менингитами. Иммунофенотипирование клеток крови и ЦСЖ осуществляли методом проточной цитометрии с применением моноклональных антител против CD3, CD4, CD8, CD19, CD16, CD56, CD25 и CD95. Содержание цитокинов определяли в иммуноферментном анализе, IgG — методом количественной иммунотурбидиметрии. В остром периоде вирусных менингитов в крови пациентов отмечено снижение доли NK и активированных CD25⁺ клеток при увеличении числа В-лимфоцитов, наряду с ростом сывороточного уровня цитокинов IFN γ , IL-8 и IL-10. В ЦСЖ накапливались Т-лимфоциты с преобладанием CD4⁺ Т-клеток и, в меньшей степени, CD25⁺ и CD95⁺ клетки, NK и В-лимфоциты. Интратекально превалировал ответ IL-6 при росте концентраций также IL-8 и IL-10. В остром периоде бактериальных менингитов в крови снижалось относительное содержание CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ Т-лимфоцитов, NK, CD25⁺ и CD95⁺ клеток при, напротив, резком увеличении пула В-клеток, одновременно с выраженным системным ответом IL-8 и IL-10. В ЦСЖ относительное содержание Т-лимфоцитов соответствовало показателям в крови, тогда как число (%) NK его превышало, а содержание В-лимфоцитов было в 3–4 раза выше, чем у пациентов с вирусными менингитами. Интратекально имел место ответ IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN γ и IL-4, а также 10-кратный рост уровня IgG. Таким образом, перераспределение субпопуляций лимфоцитов, а также системный и локальный ответ цитокинов при менингитах у детей имеют как общие черты, так и существенные особенности в зависимости от этиологии и тяжести процесса. Фенотипирование лимфоцитов и определение цитокинов и иммуноглобулинов одновременно в двух средах позволяет прояснить патогенетическое значение иммунологических сдвигов в крови и ЦСЖ пациентов в аспекте взаимодействия клеточных и гуморальных факторов системного и локального иммунного ответа при нейроинфекциях различной этиологии.

Ключевые слова: лимфоциты, субпопуляции, цитокины, иммуноглобулины, цереброспинальная жидкость, менингиты, дети.

Адрес для переписки:

Железникова Галина Федоровна
197002, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, 9,
ФГБУ НИИ детских инфекций ФМБА России.
Тел.: 8 905 267-41-32 (моб.).
E-mail: zheleznikova.galina@gmail.com

Contacts:

Galina F. Zheleznikova
197002, Russian Federation, St. Petersburg, Prof. Popova str., 9,
Scientific and Research Institute of Children's Infections.
Phone: +7 905 267-41-32 (mobile).
E-mail: zheleznikova.galina@gmail.com

Библиографическое описание:

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. doi: 10.15789/2220-7619-2016-1-33-44

© Алексеева Л.А. и соавт., 2016

Citation:

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 // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2016, vol. 6, no. 1, pp. 33–44. doi: 10.15789/2220-7619-2016-1-33-44

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2016-1-33-44>

LYMPHOCYTE SUBSETS AND CYTOKINES IN BLOOD AND CEREBROSPINAL FLUID IN CHILDREN WITH VIRAL AND BACTERIAL MENINGITIS

Alekseeva L.A., Zheleznikova G.F., Zhirkov A.A., Skripchenko N.V., Vilnits A.A., Monakhova N.E., Bessonova T.V.
Scientific Research Institute of Children's Infections, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Introduction of flow cytometry caused an increase in the investigation of liquor lymphocyte pool phenotype in the case of different brain disorders, including viral and bacterial meningitis, however this type of research in children has been relatively rare. Phenotype and lymphocyte functions are under cytokine control system, therefore detection of interconnections between lymphocyte pool subpopulation composition and cytokine level in blood and liquor of the patients concerns a great interest. The purpose of this research was to study lymphocyte subpopulation composition and the level of cytokines IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IFN α , IFN γ and IL-4, and also IgG in liquor and blood of children with viral and bacterial meningitis. There was performed blood and liquor investigation in 46 children aged from 1 to 16 years old with viral (n = 35) and bacterial (n = 11) meningitis. Immunophenotyping of blood and liquor cells was performed by the method of flow cytometry with the use of monoclonal antibodies to CD3, CD4, CD8, CD19, CD16, CD56, CD25 and CD95. The content of cytokines was detected in ELISA, and that of IgG — by the method of quantitative immunoturbidimetry. During an acute period of viral meningitis there was detected a decrease in NK portion and activated CD25⁺ cells in the blood of patients accompanied by the increase in B-lymphocytes number, along with cytokine IFN γ , IL-8 and IL-10 serum level rise. There was determined T-lymphocytes accumulation in liquor with the prevalence of CD4⁺ T-cells and, to a lesser degree, CD25⁺ and CD95⁺ cells, NK and B-lymphocytes. Intrathecally there was noted the predominance of IL-6 response accompanied by the growth of IL-8 and IL-10 concentration as well. During an acute period of bacterial meningitis there was noted a decrease in percentage of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ T-lymphocytes, NK, CD25⁺ and CD95⁺ cells, along with, on the contrary, sharp increase in B-cells pool, simultaneously with an expressed system response of IL-8 and IL-10. Liquor T-lymphocyte content was relatively correlated with blood indicators whereas the fraction of NK exceeded it, and B-lymphocyte content was 3–4 times higher than in patients with viral meningitis. There was IL-6, IL-10, IFN γ and IL-4 response intrathecally, and 10-fold growth of IgG level. Thus, the redistribution of lymphocyte subpopulations, and system and local cytokine response in children with meningitis have both common and special features depending on the aetiology and severity of disease. Phenotyping of lymphocytes and determination of both cytokines and immunoglobulins simultaneously in two biologic fluid allow to clear up the pathogenetic value of immunologic abnormalities in blood and cerebrospinal fluid of the patients in the aspect of interactions between cell and humoral factors of system and local immune response in neuroinfections of various aetiology.

Key words: lymphocytes, subpopulations, cytokines, immunoglobulines, cerebrospinal fluid, meningitis, children.

Введение

Менингиты (воспаление оболочек мозга) подразделяют по типу возбудителя на вирусные и бактериальные, а по характеру воспаления — на серозные и гнойные. Серозные менингиты имеют, в основном, вирусную природу, среди вирусов-возбудителей доминируют энтеровирусы. Бактериальные гнойные менингиты (БГМ) у детей старше 1 года и взрослых чаще всего вызываются менингококком (*Neisseria meningitidis*), в 75–80% случаев в сочетании с менингококцемией. БГМ остаются наиболее грозной патологией среди инфекционных заболеваний у детей: при отсутствии лечения летальность достигает 100%. В то же время серозные менингиты обычно имеют доброкачественное течение. До сих пор основным лабораторным критерием ранней дифференциальной диагностики между серозными и гнойными менингитами служат различия пула лейкоцитов крови в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) — умеренный лимфоцитарный плеоцитоз при серозном и высокий нейтрофильный плеоцитоз при гнойном менингите [13]. Многие исследователи разделя-

ют мнение о необходимости расширения иммунологических критериев диагностики заболеваний центральной нервной системы (ЦНС) путем оценки соотношения различных субпопуляций лимфоцитов непосредственно в интратекальном пространстве [15, 17, 19, 20, 22].

Известно, что мозг защищен от попадания клеток иммунной системы с периферии гематоэнцефалическим барьером (ГЭБ), но при этом обладает собственным защитным потенциалом. Проникновение возбудителя или его антигенов в ЦНС вызывает врожденный иммунный ответ периваскулярных макрофагов, микроглии и астроцитов. Антиген-специфические Т- и В-лимфоциты формируются на периферии в ходе системного адаптивного иммунного ответа и рекрутируются в ЦНС через стимулированный эпителий ГЭБ [4]. В течение двух последних десятилетий расширяется представление о важной роли Т-лимфоцитов в иммунологическом контроле ЦНС не только в условиях воспаления, но и в нормальных физиологических условиях [14, 18, 30]. Еще в 90-х гг. Svenningsson A. и соавт., используя метод точной цитометрии, установили, что в ЦСЖ

здоровых взрослых доноров абсолютное большинство (97%) лимфоцитов составляют CD3⁺ Т-клетки (фенотипа CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток памяти — CD45RO⁺), при незначительном количестве В-лимфоцитов (< 1%) и CD16⁺ натуральных киллеров (NK) (2%) [28]. Позднее de Graaf M. и соавт. уточнили, что около 70% Т-лимфоцитов в нормальной ЦСЖ представлены CD4⁺ Т-клетками, причем большинство из них (около 90%) имеют фенотип Т-клеток центральной памяти [14]. По данным Kivisäkk P. и соавт., CD4⁺CD45RA⁻CD27⁺ Т-клетки центральной памяти могут проникать в ЦСЖ через взаимодействие Р-селектина с молекулой межклеточной адгезии-1 в венах хороидального сплетения и субарахноидального пространства. Это подтверждает общую гипотезу о том, что Т-клетки центральной памяти попадают в ЦСЖ непосредственно из кровотока, сохраняя способность инициировать локальные иммунные реакции или возвращаться во вторичные лимфоидные органы [18]. Возможно, это механизм постоянного интраклеточного иммунологического надзора за персистирующей вирусной инфекцией [15].

Широкое внедрение проточной цитометрии способствовало росту исследований фенотипического состава пула лимфоцитов ЦСЖ при различных заболеваниях ЦНС, включая вирусные и бактериальные менингиты [19, 22, 27, 30]. В большинстве работ иммунофенотипирование клеток проводили параллельно в крови и ЦСЖ, используя этот подход для прояснения особенностей иммунопатогенеза различных заболеваний ЦНС. Следует отметить, что за последние 20 лет фенотипирование клеток ЦСЖ при менингитах у детей проводилось сравнительно редко [17, 20, 21, 24, 29]. Обращает на себя внимание также недостаток исследований клеток с маркером ранней активации — CD25(IL-2R α), готовых к пролиферации и дифференцировке, и маркером поздней активации — CD95(Fas/Apo-1), готовых к апоптозу через взаимодействие Fas/Fas-лиганд [12]. Ранее нами установлена высокая клиническая информативность определения CD25⁺ и CD95⁺ клеток в крови с подсчетом индекса активации CD25/CD95 у детей с вирусными и бактериальными инфекциями [5, 6, 8].

Фенотип, миграционная активность и функции лимфоцитов находятся под строгим контролем системы иммунорегуляторных пептидов — цитокинов, поэтому локальная и системная продукция цитокинов являются ключевыми звеньями иммунной защиты при любой инфекции. Многочисленные исследования демонстрируют возможность использования параметров ответа цитокинов для прогноза течения и исхода инфекционных заболеваний, в том числе нейро-

инфекций [3]. В связи с этим большой интерес представляет выявление взаимосвязей между субпопуляционным составом пула лимфоцитов и уровнем цитокинов в крови и ЦСЖ у пациентов с инфекциями ЦНС.

Целью настоящего исследования являлось изучение субпопуляционного состава лимфоцитов и уровня цитокинов IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IFN α , IFN γ в цереброспинальной жидкости и крови при вирусных и бактериальных менингитах у детей.

Материалы и методы

Проведено параллельное исследование крови и ЦСЖ 46 детей в возрасте от 1 года до 16 лет, из них у 35 диагностирован вирусный менингит (ВМ), у 11 — бактериальный гнойный менингит (БГМ). Дети с ВМ были несколько старше (от 3 до 16 лет), дети с БГМ — от 1 года до 9 лет. Течение ВМ было, в основном, средней тяжести, БГМ — тяжелым. У 17 из 35 детей с ВМ установлена энтеровирусная (EV-68, EV-70, ЕСНО 6) этиология, у остальных вирус-возбудитель не определен. Из 11 детей с БГМ у 5 выявлена инфекция *Neisseria meningitidis*, у 1 ребенка — *Streptococcus pneumoniae*, у 1 — иерсинии, у 4 этиология БГМ осталась неясной.

Забор крови и ЦСЖ осуществляли дважды: в остром периоде (в течение первых 5 сут от начала болезни, до лечения) и в периоде реконвалесценции: через 12–15 дней при ВМ (14 \pm 0,3 сут) и 6–13 дней при БГМ (8,5 \pm 1,2 сут). Иммунофенотипирование клеток крови и ЦСЖ осуществляли с помощью проточного цитофлюориметра FACSCalibur (Becton Dickinson, BD) в программах MultiSet и CellQuest. Для оценки относительного содержания субпопуляций лимфоцитов использованы тест-системы BD MultiTEST с 4-цветной панелью антител: CD3/CD8/CD45/CD4 и CD3/CD16⁺CD56/CD19, меченных флюорохромами FITC, PE, PerCP и APC. Для расчета абсолютного содержания субпопуляций использованы показатели абсолютного количества лимфоцитов, полученные при анализе крови на гематологическом анализаторе Cell Dyn1800 (Abbott, США). Содержание клеток с маркерами активации и апоптоза среди лейкоцитов крови и ЦСЖ определяли с использованием моноклональных антител против CD25 и CD95 фирмы BD согласно инструкциям производителя. Определение иммуноглобулина G проведено методом количественной иммунотурбидиметрии на биохимическом анализаторе CLIMA (Испания) с использованием тест-систем фирмы Sentinel (Италия). Концентрации цитокинов в сыворотке крови и ЦСЖ определяли в иммуноферментном анализе с помощью тест-систем ООО «Цитокин»

(Санкт-Петербург). Контрольную группу для оценки концентраций цитокинов и IgG в сыворотке крови составляли практически здоровые дети ($n = 15$), в ЦСЖ — дети, переносящие ОРВИ с менингеальными явлениями ($n = 22$) [1]. Результаты обрабатывали с помощью программного обеспечения Microsoft Excel и GraphPad Prism. При статистической обработке данных использовали t -критерий Стьюдента, непараметрический критерий U Манна–Уитни и коэффициент линейной корреляции r .

Результаты

По данным литературы, у здоровых детей в возрастном интервале от 1 года до 16 лет соотношение основных субпопуляций среди Т-лимфоцитов крови изменяется незначительно и практически соответствует показателям у взрослых здоровых доноров [11, 25]. Эти сведения дают возможность сопоставить от-

носительное содержание субпопуляций лимфоцитов у детей в возрасте от 1 года до 16 лет, переносящих вирусные или бактериальные менингиты (табл. 1). Оценивая отклонение показателей от нормы, мы использовали данные Красновой Е.И. с соавт. (2005), определивших методом проточной цитометрии относительное и абсолютное содержание основных субпопуляций лимфоцитов в крови 30 практически здоровых детей в возрасте от 2 до 14 лет [9]. В качестве контроля содержания в крови CD25⁺ и CD95⁺ клеток использовали собственные данные, полученные ранее при фенотипировании лимфоцитов у 10 практически здоровых детей [5].

При вирусных менингитах (ВМ) относительное количество Т-клеток основных субпопуляций (CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺) среди лимфоцитов крови в обе фазы болезни не отличалось от показателей у практически здоровых детей. В отличие от Т-лимфоцитов, число CD16⁺CD56⁺ НК оказалось существенно сниженным по срав-

ТАБЛИЦА 1. ОТНОСИТЕЛЬНОЕ СОДЕРЖАНИЕ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ В КРОВИ И ЦСЖ У ДЕТЕЙ С ВИРУСНЫМ ИЛИ БАКТЕРИАЛЬНЫМ МЕНИНГИТОМ (в %)

CD ⁺ клетки	Нормы в крови	Период болезни	Вирусный менингит (n = 35/14) [#]		Бактериальный менингит (n = 6/4) [#]	
			Кровь	ЦСЖ	Кровь	ЦСЖ
CD3 ⁺ Т-клетки	65,8±5,6	Острый	66,2±1,3	83,6±1,5 $p < 0,0001$	51,2±7,0 ^{***}	52,7±10,5 ^{***}
		РКВ	69,4±1,6	84,5±2,3 $p < 0,0001$	71,7±3,1 ^{**}	77,7±6,0
CD4 ⁺ Т-клетки	41,3±3,8	Острый	36,3±1,1	52,9±2,8 $p < 0,0001$	28,2±2,5 ^{***}	34±8,7 ^{***}
		РКВ	38,3±1,8	49,3±4,5 $p < 0,05$	40,2±4,5 ^{**}	40,7±7,8
CD8 ⁺ Т-клетки	31,2±3,4	Острый	24,6±0,7	18,6±1,6 $p < 0,01$	18±3,5 [*]	11,3±3,8
		РКВ	25,6±1,6	19,5±2,5 $p < 0,05$	23,5±1,7	17±2,8
Индекс CD4/CD8	1,31±0,11	Острый	1,53±0,07	3,51±0,20 $p < 0,0001$	1,72±0,25	4,09±1,14
		РКВ	1,67±0,17	3,08±0,63 $p < 0,05$	1,71±0,17	2,37±0,27
CD16 ⁺ CD56 ⁺ НК	14,2±0,3	Острый	10,5±0,9 [*]	8,6±0,9	5±1,9 ^{***}	15,5±7,4
		РКВ	10,7±1,5 [*]	5,9±1,1 $p < 0,05$	7±0,4 [*]	13,2±6,8
CD19 ⁺ В-клетки	11,3±0,6	Острый	20,8±1,1 [*]	4,8±1,0 $p < 0,0001$	41,4±8,5 ^{***}	18,8±5,1 ^{***} $p < 0,05$
		РКВ	17±1,2 [*]	5,5±1,0 $p < 0,0001$	18,5±2,4 ^{**}	4,25±2,4 ^{**} $p < 0,05$
CD25 ⁺ клетки	18,8±1,8	Острый	11±0,75 [*]	11,5±1,4	7,20±1,3 ^{***}	н.д.
		РКВ	8,4±0,9 [*]	13,9±3,3	8,5±1,0 [*]	7,5±0,5
CD95 ⁺ клетки	22,2±1,6	Острый	21±1,4	16±1,8 $p < 0,05$	15±2,5 ^{***}	н.д.
		РКВ	19,4±1,8	19,3±3,6	21±2,3	18±0,9

Примечания. Нормы из ссылок [9] и [5] (подробнее в тексте); [#] — число больных, обследованных в остром периоде/периоде реконвалесценции (РКВ). В столбцах с данными в ЦСЖ указаны уровни достоверности (p) отличия от показателя в крови; ^{*} — достоверное отличие от нормы, ^{**} — от показателя в остром периоде, ^{***} — от показателя при вирусном менингите при p по крайней мере $< 0,05$; н.д. — нет данных.

нению с нормой, тогда как содержание CD19⁺ В-лимфоцитов в остром периоде ВМ было, напротив, вдвое выше нормы и оставалось повышенным в периоде клинического выздоровления. Доля активированных CD25⁺ клеток в обе фазы болезни оказалась существенно сниженной по сравнению с контролем. В то же время число CD95⁺ клеток не отличалось от нормы, результатом чего было снижение индекса CD25/CD95 (рассчитанного по средним значениям) до 0,5 в остром периоде и 0,4 в периоде реконвалесценции против 0,85 в контроле.

Оценить отклонения в распределении субпопуляций лимфоцитов в ЦСЖ пациентов от показателей в нормальном ЦСЖ у здоровых детей оказалось невозможным, так как спинномозговая пункция проводится строго по показаниям, и в доступных публикациях группы контроля отсутствуют [17, 20, 21, 24, 29]. Большой интерес, однако, представляет сопоставление этих показателей в крови и ЦСЖ детей с ВМ (см. табл. 1). Доля CD3⁺ и CD4⁺ Т-лимфоцитов в ЦСЖ была значительно больше, а CD8⁺ Т-лимфоцитов — значительно меньше, чем в крови. В связи с этим индекс CD4/CD8 в ЦСЖ примерно вдвое превышал его значение в крови как в остром периоде ВМ, так и при выздоровлении. Относительное число НК в остром периоде болезни было сходным в ЦСЖ и кровотоке, но в периоде выздоровления снижалось в ЦСЖ, но не в крови. Содержание (%) В-лимфоцитов в остром периоде ВМ было в ЦСЖ примерно в 4 раза меньше, чем в крови, причем различия сохранялись и в периоде выздоровления. Число (%) в ЦСЖ CD25⁺ клеток в острой фазе ВМ совпадало с показателем в крови, а в фазе рекон-

валесценции даже несколько его превышало. Но доля CD95⁺ клеток в остром периоде болезни оказалась существенно меньше в ЦСЖ, чем в крови, уравниваясь к выздоровлению. В итоге индекс CD25/CD95 в ЦСЖ был выше, чем в крови, составляя 0,72 в оба периода болезни.

В остром периоде БГМ субпопуляционный состав лимфоцитов крови имел существенные отличия от показателей при ВМ (см. табл. 1). У пациентов с БГМ относительное содержание в крови CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ Т-клеток и НК было значительно снижено по сравнению с нормой и показателем при ВМ. Напротив, доля В-клеток примерно в 4 раза превышала норму и вдвое — их содержание при ВМ. В периоде реконвалесценции показатели возвращались к базальному уровню, за исключением НК, число которых оставалось сниженным. Достоверно сниженным в крови оказалось также относительное содержание активированных CD25⁺ и CD95⁺ клеток по сравнению с их уровнем при ВМ и с нормой.

Абсолютное содержание клеток всех субпопуляций прямо связано с общим количеством лимфоцитов, но ряд авторов считают оценку пула клеток отдельных субпопуляций не менее информативной, чем их относительного числа [14, 19, 25]. Исходя из этих предпосылок, мы сравнили абсолютное содержание основных субпопуляций лимфоцитов крови и ЦСЖ у детей с ВМ и БГМ (табл. 2). В остром периоде ВМ абсолютное число в циркуляции CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ Т-клеток, а также НК не отличалось от нормальных показателей. Исключение составил пул В-лимфоцитов, достоверно превышающий базальный уровень в обе фазы болезни.

ТАБЛИЦА 2. АБСОЛЮТНОЕ СОДЕРЖАНИЕ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ В КРОВИ И ЦСЖ У ПАЦИЕНТОВ С ВИРУСНЫМ ИЛИ БАКТЕРИАЛЬНЫМ МЕНИНГИТОМ

CD ⁺ клетки	Нормы в крови, × 10 ⁹ /л	Период болезни	Вирусный менингит (n = 35/14)*		Бактериальный менингит (n = 6/4)*	
			Кровь, × 10 ⁹ /л	ЦСЖ, × 10 ⁶ /л	Кровь, × 10 ⁹ /л	ЦСЖ, × 10 ⁶ /л
CD3 ⁺ Т-клетки	1,4±0,4	Острый	1,48±0,14	149±25	1,09±0,22	308±102
		РКВ	2,21±0,2**	16,6±5,6**	3,73±1,02**	21,2±8,6**
CD4 ⁺ Т-клетки	0,8±0,1	Острый	0,82±0,08	103±19	0,63±0,14	214±77
		РКВ	1,21±0,1**	10±3,3**	2,06±0,56**	11±4,1**
CD8 ⁺ Т-клетки	0,6±0,1	Острый	0,55±0,05	32,2±5,5	0,36±0,06***	74,7±26,5
		РКВ	0,83±0,1**	4,2±2,0**	1,17±0,28**	4,5±1,8**
Индекс CD4/CD8	1,3	Острый	1,49	3,22	1,75	2,85
		РКВ	1,46	2,38	1,76	2,44
CD16 ⁺ CD56 ⁺ NK	0,32±0,04	Острый	0,24±0,03	13,1±2,3	0,10±0,04***	31,6±9,6***
		РКВ	0,36±0,07	0,8±0,15**	0,38±0,13**	1,9±0,4***
CD19 ⁺ В-клетки	0,25±0,03	Острый	0,47±0,06*	7,5±2,5	1,19±0,44***	99,6±48,2***
		РКВ	0,55±0,07*	0,87±0,3**	1,06±0,45***	0,85±0,44**
CD25 ⁺ клетки	0,67±0,12	Острый	0,25±0,03*	19,3±3,9	0,15±0,03***	н.д.
		РКВ	0,25±0,03*	2,7±0,8**	0,5±0,2	2,8±0,8
CD95 ⁺ клетки	0,75±0,06	Острый	0,48±0,05*	25,5±4,5	0,33±0,09*	н.д.
		РКВ	0,60±0,07	4,6±2,0**	1,07±0,28**	7,2±2,2

Примечания. Индекс CD4/CD8 рассчитан по средним данным; остальные обозначения те же, что в таблице 1.

Абсолютное число в крови CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ Т-лимфоцитов в периоде реконвалесценции существенно нарастало, не выходя, однако, за пределы нормальных колебаний. Напротив, в ЦСЖ абсолютное количество клеток всех субпопуляций в фазе выздоровления снижалось примерно на порядок, отражая купирование воспалительного процесса в мозговых оболочках. Следует отметить, что индекс CD4/CD8 в ЦСЖ был значительно выше, чем в крови, повторяя закономерность, обнаруженную при учете относительного содержания CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов.

Абсолютное содержание в крови CD25⁺ клеток у пациентов с ВМ было существенно снижено относительно нормы как в остром периоде, так и при выздоровлении, а CD95⁺ клеток — только в острую фазу. Пул CD25⁺ и CD95⁺ клеток в ЦСЖ к выздоровлению многократно (в 5–6 раз) уменьшался ($p < 0,001$), как и других субпопуляций лимфоцитов. Соответственно более высокому относительному содержанию (см. табл. 1), пул CD95⁺ клеток был в крови пациентов с ВМ примерно вдвое большим, чем CD25⁺ клеток ($p < 0,001$ в обе фазы болезни).

В острую фазу БГМ абсолютное содержание в крови CD3⁺ и CD4⁺ Т-лимфоцитов было слегка снижено, но не отличалось достоверно от нормальных показателей или значений при ВМ. Обнаружено достоверное снижение в циркуляции пула CD8⁺ Т-клеток и NK при, напротив, мобилизации в кровь В-лимфоцитов. Соответственно, количество в циркуляции CD8⁺ Т-клеток и NK было существенно ниже, а В-клеток — выше, чем в остром периоде ВМ. В остром периоде БГМ значительно сниженным в крови оказался также пул CD25⁺ и CD95⁺ клеток. Как и у больных с ВМ, соотношение CD25/CD95 в остром периоде БГМ приблизительно равнялось 0,5. В периоде реконвалесценции количество в крови клеток большинства субпопуляций возрастало в 3–4 раза по сравнению с острым периодом, соответственно росту общего пула лимфоцитов. Исключение составили В-лимфоциты, содержание которых было высоким в обе фазы болезни.

В отличие от показателей в крови, в ЦСЖ абсолютное содержание клеток всех субпопуляций в остром периоде БГМ оказалось, по средним данным, несколько выше, чем у пациентов с ВМ (см. табл. 2). Наибольшие различия касались двух субпопуляций — NK и В-лимфоцитов, достоверные по критерию U Манна–Уитни. Количество NK в ЦСЖ детей с БГМ и в периоде выздоровления осталось вдвое большим, чем у детей с ВМ. Как и при ВМ, индекс CD4/CD8, рассчитанный по среднему абсолютному содержанию этих клеток, в ЦСЖ детей с БГМ был выше, чем в крови, в обе фазы болезни.

Возникает вопрос: зависит ли субпопуляционный состав лимфоцитов ЦСЖ от интенсивности воспаления в мозговых оболочках? С целью выявления возможных взаимосвязей между остротой локального воспалительного ответа и соотношением в ЦСЖ отдельных субпопуляций лимфоцитов, мы провели корреляционный анализ данных фенотипирования с уровнем цитоза в ЦСЖ в основной группе пациентов с ВМ (табл. 3). Показатели цитоза в остром периоде ВМ составляли 243 ± 38 ($\times 10^6/\text{л}$) клеток, а в периоде выздоровления — $13,7 \pm 1,9$ ($\times 10^6/\text{л}$) клеток против $3,5 \pm 0,8$ ($\times 10^6/\text{л}$) в группе контроля ($p < 0,001$). В остром периоде ВМ, как и в периоде реконвалесценции, не обнаружено достоверных связей между уровнем цитоза и относительным содержанием в ЦСЖ основных субпопуляций лимфоцитов: CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ Т-клеток, NK и В-лимфоцитов. Исключение составили CD95⁺ клетки и, вероятно, CD25⁺ клетки, доля которых была связана слабой отрицательной корреляцией с уровнем цитоза ($-0,34$ и $-0,30$ соответственно). Напротив, в острой фазе ВМ обнаружена сильная прямая взаимосвязь между уровнем цитоза и абсолютным содержанием CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ Т-лимфоцитов и NK, а также более слабая, но достоверная взаимосвязь между уровнем цитоза и пулом В-лимфоцитов, CD25⁺ и CD95⁺ клеток. В периоде выздоровления также прослеживалась сильная прямая связь между уровнем цитоза и абсолютным ко-

ТАБЛИЦА 3. КОЭФФИЦИЕНТЫ КОРРЕЛЯЦИИ (r) МЕЖДУ ОТНОСИТЕЛЬНЫМ И АБСОЛЮТНЫМ СОДЕРЖАНИЕМ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ И УРОВНЕМ ЦИТОЗА В ЦСЖ У ПАЦИЕНТОВ С ВИРУСНЫМИ МЕНИНГИТАМИ

Относительное содержание CD ⁺ клеток, %							Абсолютное содержание CD ⁺ клеток, $\times 10^6/\text{л}$						
CD3	CD4	CD8	CD16	CD19	CD25	CD95	CD3	CD4	CD8	CD16	CD19	CD25	CD95
Острый период (n = 34)													
-0,03	0,16	0,06	0,13	-0,02	-0,3	-0,34	0,78	0,76	0,75	0,81	0,4	0,37	0,42
-	-	-	-	-	-	< 0,05	< 0,001				< 0,05		
Период реконвалесценции (n = 12)													
0,29	0,1	0,41	-0,41	-0,17	-0,19	0,08	0,99	0,97	0,98	0,85	0,92	0,87	0,96
-	-	-	-	-	-	-	< 0,001						

Примечание. Прочерк — корреляции недостоверны ($p > 0,05$) для данного количества пар значений.

личеством в ЦСЖ всех субпопуляций лимфоцитов (коэффициент корреляции r варьировал от 0,85 до 0,99).

Важной задачей исследования было сопоставление модуляций субпопуляционного состава лимфоцитов крови и ЦСЖ с системным и локальным уровнем гуморальных факторов иммунной защиты. В таблице 4 представлены концентрации цитокинов и иммуноглобулина G (IgG) в крови и ЦСЖ пациентов в остром периоде ВМ и БГМ. У детей с ВМ системный ответ цитокинов характеризовался значительным накоплением в циркуляции провоспалительных цитокинов IFN γ и IL-8 (примерно в 5 раз), а также противовоспалительного цитокина IL-10 (примерно в 20 раз) по сравнению с нормой. Содержание в крови цитокина Th2-типа IL-4 было на порядок ниже нормы. В ЦСЖ пациентов уровни трех цитокинов достоверно превышали их концентрации у детей группы «симптоматического» [19] контроля — IL-6 (более чем в 50 раз), IL-10 (более чем в 30 раз) и IL-8 (примерно в 8 раз).

Большой интерес представляет соотношение концентраций цитокинов в ЦСЖ и крови, которое наглядно иллюстрирует индекс ЦСЖ/кровь (Л/Кр), рассчитанный по средним данным (см. табл. 4). Концентрации большинства цитокинов в ЦСЖ у пациентов с ВМ были существенно ниже их значений в сыворотке крови: IL-1 β почти в 5 раз, IL-8 — более чем вдвое, IL-10 — почти втрое, IFN α — более чем в 2 раза, IFN γ приблизительно в 8 раз. Исключением из правила оказались IL-6 и IL-4, содержание которых в ЦСЖ многократно превышало сывороточный уровень (индекс Л/Кр составил 16,7 и 5,3 соответственно).

У детей с БГМ показатели в крови только двух цитокинов достоверно превышали уро-

вень контроля: IL-8 (в 6 раз) и IL-10 (в 28 раз) (см. табл. 4). Но нельзя обойти вниманием и явную тенденцию к накоплению в циркуляции IL-6, концентрации которого в среднем были более чем втрое выше нормы. В ЦСЖ происходило выраженное нарастание уровней IL-6 и IL-10, до 70- и 200-кратного превышения данных симптоматического контроля, а у части пациентов в ЦСЖ накапливался также IL-8, о чем свидетельствует более чем 10-кратный рост его среднего уровня относительно контроля. Уровни в ЦСЖ IL-6 и IL-10 примерно вдвое превышали показатели в крови, а содержание IFN γ и IL-4 было почти одинаковым в крови и ЦСЖ.

Мы не обнаружили значительных модуляций сывороточных уровней IgG у детей с ВМ или БГМ в оба срока обследования (период реконвалесценции в табл. 4 не показан). Однако у пациентов обеих групп в остром периоде болезни установлен достоверный рост в ЦСЖ концентраций IgG по сравнению с нормой, причем при БГМ показатель был более чем в 3 раза выше, чем при ВМ. К периоду выздоровления уровень IgG в ЦСЖ снижался почти до нормы (3,2 \pm 0,4 мг/дл при ВМ и 5,5 \pm 1,7 при БГМ против 2,0 \pm 0,4, $p > 0,05$).

Обсуждение

Сравнение относительного содержания клеток основных субпопуляций лимфоцитов в крови и ЦСЖ детей с менингитами показало, что у детей с ВМ в остром периоде болезни количество CD3 $^+$ и CD4 $^+$, но не CD8 $^+$ Т-клеток в ЦСЖ значительно превышало показатели в крови, что согласуется с данными других авторов, полученных при обследовании детей, переносивших энтеровирусные (ЕCHO 30) менингиты [24, 29]. Однако при обследовании пациентов в пе-

ТАБЛИЦА 4. КОНЦЕНТРАЦИИ ЦИТОКИНОВ И IgG В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И ЦСЖ ДЕТЕЙ С ВИРУСНЫМИ И БАКТЕРИАЛЬНЫМИ МЕНИНГИТАМИ В ОСТРОМ ПЕРИОДЕ БОЛЕЗНИ

Фактор	Вирусный менингит			Бактериальный менингит			К1 n = 15	К2 n = 22	К2/К1
	Кровь n = 26	ЦСЖ n = 23	Л/Кр	Кровь n = 9	ЦСЖ n = 8	Л/Кр			
IL-1 β	14,9 \pm 3,8	3,2 \pm 1,1**	0,21	16,1 \pm 3,6	н.д.	–	27 \pm 7	2,7 \pm 0,8	0,1
IL-6	21,1 \pm 5,4	351 \pm 42***	16,7	174 \pm 81	429 \pm 75***	2,46	49 \pm 10	5,9 \pm 1,8	0,12
IL-8	230 \pm 42*	111 \pm 40***	0,48	309 \pm 124*	193 \pm 130	0,62	49 \pm 11	14,3 \pm 7,7	0,29
IL-10	97 \pm 31*	36 \pm 13*	0,37	139 \pm 65*	240 \pm 101*	1,73	5 \pm 3	1,15 \pm 0,3	0,23
IFN α	17,7 \pm 3,6	7,7 \pm 1,2**	0,43	14,2 \pm 4,5	9,5 \pm 3,1	0,67	10 \pm 7	н.д.	–
IFN γ	119 \pm 29*	14,4 \pm 3,6**	0,12	18,8 \pm 7,0***	21,4 \pm 6,4	1,14	26 \pm 8	н.д.	–
IL-4	4,2 \pm 1,7*	22,2 \pm 9,9	5,3	8 \pm 2*	10,8 \pm 6,4	1,35	51 \pm 7	9 \pm 3,2	0,18
IFN γ /IL-4	28	0,65	–	2,4	2	–	0,5	–	–
IgG	12,2 \pm 0,7	5,2 \pm 0,5*	0,43	10,4 \pm 1,6	18,2 \pm 5,6***	1,75	10,8 \pm 1	2,0 \pm 0,4	0,18

Примечания. Цитокины в пг/мл, IgG в сыворотке крови в г/л, в ЦСЖ — в мг/дл. К1 — контроль показателей в крови, практически здоровые дети, К2 — контроль показателей в ЦСЖ, дети с менингеальными симптомами при ОРВИ [1]. * — достоверное отличие ($p < 0,05$ и менее) от К, ** — от показателя в сыворотке крови, *** — от показателя при ВМ. Индексы Л/Кр (ЦСЖ/кровь) и IFN γ /IL-4 рассчитаны по средним данным; н.д. — нет данных.

рию выздоровления нами не обнаружены рост в ЦСЖ доли $CD8^+$ Т-лимфоцитов и снижение индекса $CD4/CD8$, отмеченные этими авторами [24, 29]. В связи с этим можно высказать предположение о роли возрастного фактора в несовпадении динамики этих клеток. Так, Matsubara T. с соавт., изучая субпопуляции лимфоцитов в ЦСЖ детей с энтеровирусными (ЕСНО 30) менингитами, выявили прямую корреляцию индекса $CD4/CD8$ с возрастом (в диапазоне от 5 месяцев до 9 лет). Это позволило авторам заключить, что $CD8^+$ Т-лимфоциты более важны в локальном иммунном ответе против вируса у детей младшего возраста по сравнению с детьми старшего возраста или со взрослыми [21]. Действительно, по данным Lerej S. с соавт. [20], изучивших фенотипический состав лимфоцитов ЦСЖ у детей в возрасте от 1 года до 4 лет с асептическим менингитом, число (%) $CD8^+$ Т-клеток было сравнительно высоким и индекс $CD4/CD8$ равнялся, в среднем, 1,4 у пациентов с менингитом, развившимся после иммунизации тройной вакциной MMR (measles-mumps-rubella), и 1,8 у детей с энтеровирусным менингитом. В то же время группа обследованных нами пациентов с ВМ более чем наполовину была представлена детьми в возрасте от 9 до 16 лет (20 из 35), чем, возможно, объясняется сходство полученных нами данных с результатами обследования взрослых пациентов с вирусными менингитами [19, 27] или острым вирусным менингоэнцефалитом [20].

Относительное число НК в остром периоде ВМ было в крови ниже нормы и сходным в ЦСЖ и кровотоке, а содержание (%) в крови В-лимфоцитов было существенно выше нормы, причем в ЦСЖ доля В-клеток была меньше, чем в крови. Тем не менее, относительное содержание в ЦСЖ клеток обеих субпопуляций, особенно В-лимфоцитов, было значительно выше, чем (по данным литературы) у взрослых пациентов без неврологических симптомов или с невоспалительными заболеваниями ЦНС. В образцах нормального ЦСЖ наибольшее содержание НК и В-лимфоцитов не превышало 5 и 2% соответственно [14, 19], при этом в остром периоде вирусного или бактериального менингита содержание в ЦСЖ НК возрастало максимально до 13–26%, а В-лимфоцитов — до 12–17% [19].

Особый интерес представляет оценка количества клеток с маркерами активации $CD25$ (IL-2R α) и апоптоза $CD95$ (Fas/Apo-1). У пациентов с ВМ относительное содержание $CD25^+$ клеток в крови оказалось сниженным, чему соответствовал сниженный индекс $CD25/CD95$. Эти результаты согласуются с данными Крыловой Н.В. и соавт. [10], которые обнаружили снижение в крови индекса $CD25/CD95$ Т-клеток

в остром периоде очаговой (но не лихорадочной) формы клещевого энцефалита у взрослых пациентов. В прежних исследованиях уход из циркуляции $CD25^+$ и, реже, $CD95^+$ клеток обнаружен нами при очаговой форме клещевого энцефалита, тяжелом течении инфекционного мононуклеоза, генерализации иерсиниозной инфекции у детей [3, 6, 8]. По-видимому, уменьшение доли $CD25^+$ клеток в крови отражает их миграцию в очаги инфекции, где они и осуществляют свои иммунные функции. С этих позиций относительно высокое содержание $CD25^+$ клеток в ЦСЖ, равное уровню в крови (см. табл. 1), может свидетельствовать об их усиленной миграции в ЦНС, что подтверждает более высокий индекс $CD25/CD95$ в ЦСЖ по сравнению с кровью, сохраняющийся и в периоде выздоровления.

Соотношения основных субпопуляций лимфоцитов в крови и ЦСЖ пациентов с БГМ имели и сходные черты, и отличия по сравнению с описанными при ВМ. В отличие от ВМ, доля $CD3^+$ Т-клеток при БГМ была одинакова в обеих средах, а содержание НК в ЦСЖ заметно выше, чем в крови, в том числе в периоде выздоровления. Однако индекс $CD4/CD8$ в ЦСЖ, как и у пациентов с ВМ, превышал значения в крови; при этом различия почти достигали уровня достоверности в обе фазы болезни ($p = 0,051$ и $0,057$ в тесте Манна–Уитни). Относительное количество В-лимфоцитов в ЦСЖ детей с БГМ в остром периоде болезни значительно превышало показатель при ВМ.

Главной чертой иммунного статуса в острой фазе БГМ было снижение в крови доли Т-клеток с одновременным накоплением В-клеток, что согласуется с данными Ishiyama T. с соавт. [17]. Однако, в отличие от данных этих авторов, у обследованных нами детей с БГМ не отмечено достоверного повышения доли $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ Т-клеток в ЦСЖ по сравнению с кровью. Несовпадения с данными [17] могут быть обусловлены различиями этиологии БГМ. В исследовании Ishiyama T. с соавт. возбудителями БГМ были бактерии *Haemophilus influenzae* и *Streptococcus pneumoniae*, тогда как у большинства обследованных нами детей с БГМ определена *Neisseria meningitidis*. Менингит, вызванный *Neisseria meningitidis*, развивается как проявление генерализованной инфекции, сопровождающейся менингококкемией и образованием очагов инфекции во многих органах и тканях [13]. Поэтому рекрутирование Т-лимфоцитов происходит не только в ЦНС, но и в другие локусы инфекции, чем можно объяснить умеренный прирост этих клеток в ЦСЖ пациентов с БГМ. С другой стороны, снижение доли Т-клеток среди лимфоцитов крови и ЦСЖ может быть результатом выраженной мобилиза-

ции В-лимфоцитов, которые в остром периоде БГМ в крови детей составляли в среднем 40%, а в ЦСЖ почти 20%. По данным Kowarik M. с соавт. [19], рост числа В-клеток в ЦСЖ взрослых пациентов характерен для воспалительных заболеваний ЦНС бактериальной и, реже, вирусной этиологии.

Доля НК, сниженная в крови относительно нормы и при ВМ, у детей с БГМ была еще ниже (примерно в 2 раза), тогда как среди клеток ЦСЖ в оба срока обследования она была выше, чем в крови, превышая также показатели в ЦСЖ пациентов с ВМ. Это позволяет предположить еще более активное участие этих клеток в локальном иммунном ответе при БГМ по сравнению с ВМ. В остром периоде БГМ оказалась сниженной частота в крови не только CD25⁺, но и CD95⁺ клеток. Эти отличия могли быть обусловлены большей остротой и тяжестью инфекционного процесса в целом при БГМ по сравнению с ВМ, о чем свидетельствуют клинические параметры болезни.

Подсчет абсолютного количества клеток всех субпопуляций в обеих средах подтвердил выявленные различия у пациентов с ВМ и БГМ, удостоверив больший приток НК и В-клеток в ЦСЖ пациентов в острой фазе БГМ, чем ВМ. К моменту клинического выздоровления пул CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ Т-клеток и НК в крови в 3–4 раза нарастал, в то время как содержание тех же клеток в ЦСЖ снижалось более чем на порядок в ходе разрешения воспалительного процесса в оболочках мозга. Эта динамика, одинаковая при ВМ и БГМ, отражает общую тенденцию к взаимосвязи между пулами лимфоцитов разных субпопуляций в системном и локальном иммунном ответе.

При корреляционном анализе показателей у детей с ВМ нами не обнаружено достоверных связей между уровнем цитоза и относительным содержанием в ЦСЖ основных субпопуляций лимфоцитов: CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ Т-клеток и В-клеток, в подтверждение аналогичным результатам других авторов [17]. Исключение составили активированные CD25⁺ и CD95⁺ клетки, доля которых в ЦСЖ оказалась связанной с уровнем цитоза слабой обратной корреляцией. В то же время абсолютное содержание в ЦСЖ клеток различного фенотипа прямо коррелировало с уровнем цитоза. По-видимому, это означает, что трафик циркулирующих лимфоцитов основных субпопуляций в мозговые оболочки происходит в прямой зависимости от общей интенсивности рекрутирования лейкоцитов крови в ЦНС, без различий в способности клеток разного фенотипа преодолевать ГЭБ. Возможно, повышенную способность проникать в ЦНС проявляют активированные CD25⁺ и CD95⁺ клетки, которые осуществляют свои

иммунные функции в ЦНС, сдерживая рекрутирование лейкоцитов, чем можно объяснить обратную связь их относительного содержания с уровнем цитоза.

Как и модуляции фенотипического состава пула лимфоцитов крови и ЦСЖ, системный и локальный ответы цитокинов также имели общие черты, но и существенные особенности при вирусных и бактериальных менингитах у детей. В остром периоде менингита, независимо от этиологии, имел место значительный подъем системной продукции цитокинов врожденного иммунитета IL-8 и IL-10. У пациентов с БГМ в дополнение к этим двум цитокинам в крови происходило накопление IL-6. Отличительной особенностью ответа детей с ВМ был высокий уровень в крови IFN γ , при этом индекс IFN γ /IL-4 составлял примерно 28, что свидетельствует о поляризации системного иммунного ответа в сторону Th1. В то же время у пациентов с БГМ нормальный уровень IFN γ в циркуляции свидетельствовал о дефиците системного иммунного ответа Th1-типа против возбудителя инфекции. В ЦСЖ пациентов обеих групп многократно возрастали уровни IL-6 и IL-8, но БГМ сопровождался также накоплением в ЦСЖ IL-10, что подтверждает результаты предыдущего исследования [1]. Следует заметить, что ответ цитокинов зависит от этиологии ВМ. Так, сравнив цитокиновый профиль при менингитах энтеровирусной (ЕСНО 30) и паротитной этиологии, авторы [16, 26] выявили накопление IL-8 в ЦСЖ детей обеих групп, высокий уровень IL-6 в ЦСЖ пациентов с энтеровирусным менингитом, но рост IL-1 β только в ЦСЖ пациентов с паротитным менингитом.

Сопоставление концентраций цитокинов в ЦСЖ и крови с подсчетом индекса ЦСЖ/кровь позволило предположить, что при ВМ основным цитокином интратекального ответа является IL-6. Действительно, Kawashima H. с соавт. (2008) установили, что подъем уровня IL-6 в ЦСЖ может служить наиболее ранним маркером острого воспаления оболочек мозга при энтеровирусных менингитах у детей [7]. Заметен также рост интратекальных концентраций IL-4 и инверсия индекса IFN γ /IL-4, отражающая различия баланса Th1/Th2 ответов на системном и локальном уровнях. При БГМ важными цитокинами локального ответа, вероятно, служат IL-6 и IL-10, наряду с умеренным ответом IFN γ и IL-4.

Каким же образом особенности системного и локального ответа цитокинов при ВМ и БГМ соотносятся с перераспределением субпопуляций лимфоцитов в крови и ЦСЖ пациентов? На наш взгляд, главным отличием системного ответа цитокинов у пациентов с ВМ является выраженная продукция IFN γ — ключевого фак-

тора врожденного и адаптивного иммунитета при вирусных и бактериальных инфекциях [2]. Адекватный системный ответ $IFN\gamma$ сочетается с ограниченной миграцией лейкоцитов в ЦНС без снижения частоты клеток основных субпопуляций лимфоцитов (за исключением $CD25^+$ и NK-клеток) и выраженной интратекальной продукцией $IL-6$. Известна связь между $IFN\gamma$ и $IL-6$ в противовирусном ответе клеток мозга. Так, Farina С. с соавт. (2005) показали, что продукция $IL-6$ астроцитами, стимулированными через TLR3, значительно усиливается под влиянием $IFN\gamma$ [4]. Вероятно, другие цитокины врожденного иммунитета ($IL-8$, $IL-10$, $IFN\alpha$) в достаточном количестве поступают из системного кровотока через активированный ГЭБ, обеспечивая противовирусную защиту ЦНС. В то же время при БГМ отсутствие системного ответа $IFN\gamma$ как главного фактора активации макрофагов сопровождается значительными изменениями иммунного статуса: снижением в крови числа $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ Т-клеток, NK, $CD25^+$ и $CD95^+$ клеток при росте пула В-клеток в крови и ЦСЖ наряду с интратекальной продукцией цитокинов $IL-6$, $IL-10$, $IFN\gamma$ и $IL-4$. По-видимому, все эти параметры отражают неэффективность системной иммунной защиты в целом и соответствуют гораздо более тяжелому течению БГМ по сравнению с ВМ.

Необходимо особо отметить, что селективная способность Т-клеток проникать в ЦНС через ГЭБ присуща им не только при патологии, но и в нормальных физиологических условиях [14, 18, 28, 30]. Поэтому развитие воспаления в ЦНС сопровождается лишь многократным усилением миграции в мозг Т-клеток с преобладанием $CD4^+$ над $CD8^+$ Т-лимфоцитами. Отсюда следует, что более специфическим параметром локальной иммунной защиты при менингитах может быть накопление в ЦСЖ активированных $CD25^+$ и $CD95^+$ клеток, NK и В-лимфоцитов, присутствующих в нормальном ЦСЖ в очень малых количествах. По представленным данным можно предположить, что NK активно мигрируют из крови в менингеальные пространства в остром периоде как ВМ, так и БГМ. В последнем случае рекрутирование NK в ЦНС еще более заметно и, возможно, связано с необходимостью восполнить недостаток $IFN\gamma$ в локальном иммунном ответе. В самом деле, содержание $IFN\gamma$ в ЦСЖ детей с БГМ было не меньше, чем в крови и превышало установленный предел (< 10 пг/мл) в нормальном ЦСЖ у детей [21].

Особый интерес вызывает накопление в крови и ЦСЖ пациентов В-клеток, гораздо более выраженное в остром периоде БГМ, чем ВМ. Это единственная субпопуляция лимфоцитов, которая в крови пациентов растет в относительном и абсолютном выражении, вероятно, по-

полняясь за счет депо В-клеток в лимфоидных органах. Интерес к В-лимфоцитам резко возрос после того, как были обнаружены скопления этих клеток в мозговых оболочках пациентов с рассеянным склерозом (РС). Считают, что роль В-клеток в ЦНС обусловлена их влиянием на Т-лимфоциты в качестве антиген-представляющих клеток, продуцирующих про- и противовоспалительные цитокины [31]. Но В-клетки могут быть также источником интратекального синтеза полиспецифических Ig, обнаруживаемых в ЦСЖ больных РС [23].

В представленном нами материале прослеживается связь между мобилизацией в кровь В-лимфоцитов и увеличением концентрации IgG в ЦСЖ пациентов. Оба параметра в гораздо большей степени выражены в остром периоде БГМ, чем ВМ. Нам не удалось верифицировать у пациентов интратекальный синтез IgG по соотношению IgG/альбумин, из чего можно заключить, что накопление IgG в ЦСЖ обусловлено их проникновением из крови из-за увеличения проницаемости ГЭБ при менингитах, особенно бактериальной этиологии [13]. Вероятно, при генерализованной бактериальной инфекции В-клетки еще в циркуляции подвергаются массивной поликлональной стимуляции липополисахаридами бактерий. По-видимому, с этим связан гуморальный профиль системного иммунного ответа при БГМ с накоплением В-клеток и IgG в ЦСЖ пациентов.

Небольшое число наблюдений не позволило в полной мере оценить клеточные и гуморальные факторы иммунной защиты в ЦСЖ пациентов с БГМ, что диктует необходимость дальнейших исследований в этом направлении.

Заключение

Таким образом, фенотипирование лимфоцитов и определение цитокинов и иммуноглобулинов одновременно в двух средах позволяет прояснить патогенетическое значение иммунологических сдвигов в крови и ЦСЖ пациентов в аспекте взаимодействия клеточных и гуморальных факторов системного и локального иммунного ответа при нейроинфекциях различной этиологии.

Благодарности

Авторы выражают благодарность руководителям отдела вирусологических и молекулярно-биологических методов исследования и отдела молекулярной микробиологии и эпидемиологии ФГБУ НИИДИ ФМБА России д.б.н. Е.А. Муриной и д.м.н., проф. С.В. Сидоренко за предоставление данных по этиологической диагностике менингитов.

Список литературы/References

1. Алексеева Л.А., Мазаева Е.М., Скрипченко Н.В., Монахова Н.Е., Бессонова Т.В. Цитокины в цереброспинальной жидкости при менингитах у детей // Журнал инфектологии. 2014. Т. 6, № 1. С. 54–59. [Alekseyeva L.A., Mazayeva E.M., Skripchenko N.V., Monakhova N.E., Bessonova T.V. Cytokines in cerebrospinal fluid in the case of meningitis in children. *Zhurnal infektologii = Journal of Infectology*, 2014, vol. 6, no. 1, pp. 54–59. (In Russ.)]
2. Железникова Г.Ф. Роль гамма-интерферона в иммунопатогенезе инфекций (обзор) // Клиническая лабораторная диагностика. 2008. № 4. С. 3–8. [Zheleznikova G.F. The role of gamma-interferon in immunopathogenesis of infections. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Clinical Laboratory Diagnostics*, 2008, no. 4, pp. 3–8. (In Russ.)]
3. Железникова Г.Ф. Цитокины как предикторы течения и исхода инфекций (обзор) // Цитокины и воспаление. 2009. Т. 8, № 1. С. 10–17. [Zheleznikova G.F. Cytokines as predictors of infection course and outcome. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2009, vol. 8, no. 1, pp. 10–17. (In Russ.)]
4. Железникова Г.Ф., Скрипченко Н.В. Иммунопатогенез инфекционно-воспалительных заболеваний ЦНС (обзор) // Журнал инфектологии. 2011. Т. 3, № 2. С. 28–32. [Zheleznikova G.F., Skripchenko N.V. Immunopathogenesis of infectious-inflammatory diseases of central nervous system. *Zhurnal infektologii = Journal of Infectology*, 2011, vol. 3, no. 2, pp. 28–32. (In Russ.)]
5. Железникова Г.Ф., Скрипченко Н.В., Моргацкий Н.В., Монахова Н.Е., Керимова Л.В. Иммунопатогенетические особенности клещевого энцефалита у детей и эффект терапии // Нейроиммунология. 2008. Т. 6, № 1–2. С. 13–22. [Zheleznikova G.F., Skripchenko N.V., Morgatsky N.V., Monakhova N.E., Kerimova L.V. Immunopathogenesis of tick-borne encephalitis (ТВЕ) in children and effects of therapy. *Neuroimmunologiya = Neuroimmunology*, 2008, vol. 6, no. 1–2, pp. 13–22. (In Russ.)]
6. Железникова Г.Ф., Иванова В.В., Васякина Л.И., Монахова Н.Е., Бехтерева М.К. Иммуный ответ при остром псевдотуберкулезе у детей // Медицинская иммунология. 2002. Т. 4, № 1. С. 45–58. [Zheleznikova G.F., Ivanova V.V., Vasjakina L.I., Monakhova N.E., Bechtereva M.K. Immune response in children with acute pseudotuberculosis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2002, vol. 4, no. 1, pp. 45–58. (In Russ.)]
7. Железникова Г.Ф., Скрипченко Н.В. Факторы иммунной защиты в цереброспинальной жидкости при вирусных инфекциях ЦНС (обзор) // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2012. № 4. С. 61–66. [Geleznikova G.F., Skripchenko N.V. Factors of immune defense in the cerebrospinal fluid in viral infections of the central nervous system. *Zhurnal neurologii i psichiatrii im. S.S.Korsakova = Journal of Neurology and Psychiatry named after S.S. Korsakov*, 2012, no. 4, pp. 61–66. (In Russ.)]
8. Иванова В.В., Железникова Г.Ф., Аксенов О.А., Насыров Р.А., Александрова Н.В., Левина А.С., Монахова Н.Е. Инфекционный мононуклеоз: клиника, патогенез, новое в диагностике и терапии // Инфекционные болезни. 2004. Т. 2, № 4. С. 5–12. [Ivanova V.V., Zheleznikova G.F., Aksenov O.A., Nasyrov R.A., Aleksandrova N.V., Levina A.S., Monakhova N.E. Infectious mononucleosis: clinical course, pathogenesis, novel in diagnostics and therapy. *Infektsionnye bolezni = Infectious Diseases*, 2004, vol. 2, no. 4, pp. 5–12. (In Russ.)]
9. Краснова Е.И., Васюнин А.В. Особенности иммунного ответа при инфекционном мононуклеозе у детей и подходы к иммуномодулирующей терапии циклофероном // Профилактическая и клиническая медицина. 2005. Т. 6, № 1. С. 76–82. [Krasnova E.I., Vasyunin A.V. Special features of immune responses in children with infectious mononucleosis and the approaches to immunomodulating therapy by cyclopheronum. *Profilakticheskaya i klinicheskaya medicina = Preventive and Clinical Medicine*, 2005, vol. 6, no. 1, pp. 76–82. (In Russ.)]
10. Крылова Н.В., Леонова Г.Н., Павленко Е.В., Запорожец Т.С., Смолина Т.П., Гажа А.К., Новиков Д.В., Ченцова И.В. Комплексная оценка состояния иммунной системы при различных формах клещевого энцефалита в остром периоде // Медицинская иммунология. 2012. Т. 14, № 4–5. С. 313–320. [Krylova N.V., Leonova G.N., Pavlenko E.V., Zaporozhets T.S., Smolina T.P., Gazha A.K., Novikov D.V., Chenzova I.V. Comprehensive assessment of immune system in various forms of tick-borne encephalitis in acute phase. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, vol. 14, no. 4–5, pp. 313–320. doi: 10.15789/1563-0625-2012-4-5-313-320 (In Russ.)]
11. Лагерева Ю.Г., Меньшиков С.В., Савинова Т.Л., Бейкин Я.Б., Черешнев В.А. Оценка содержания различных Т-эффекторных субпопуляций у детей и взрослых методом внутриклеточного окрашивания цитокинов // Медицинская иммунология. 2012. Т. 14, № 4–5. С. 295–304. [Lagereva Yu.G., Menshikov S.V., Savinova T.L., Beykin J.B., Chereshev V.A. Evaluation of T-cell effector subpopulations distribution in children and adults by means of intracellular staining of cytokines. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, vol. 14, no. 4–5, pp. 295–304. doi: 10.15789/1563-0625-2012-4-5-295-304 (In Russ.)]
12. Литвинова Л.С., Гуцол А.А., Сохоневич Н.А., Кофанова К.А., Хазиахматова О.Г., Шуплецова В.В., Кайгородова Е.В., Гончаров А.Г. Основные поверхностные маркеры функциональной активности Т-лимфоцитов (обзор) // Медицинская иммунология. 2014. Т. 16, № 1. С. 7–26. [Litvinova L.S., Gutsol A.A., Sokhonevich N.A., Kofanova K.A., Khaziakhmatova O.G., Shupletsova V.V., Kaigorodova E.V., Goncharov A.G. Basic surface markers of functional activity T-lymphocytes. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, vol. 16, no. 1, pp. 7–26. doi: 10.15789/1563-0625-2014-1-7-26 (In Russ.)]
13. Нейроинфекции у детей / Под ред. Н.В. Скрипченко. СПб.: Тактик-Студио, 2015. 856 с. [Nejroinfekcii u detej [Nervous system infections in children] / Ed. by Skripchenko N.V. *St. Petersburg: Taktik-Studio*, 2015. 856 p. (In Russ.)]
14. De Graaf M., Smitt P., Luitwieler R., van Vetzen Z., van den Broek P.D., Kraan J., Gratama J.W. Central memory CD4⁺ T cells dominate the normal cerebrospinal fluid. *Cytometry Part B*, 2011, vol. 80B, Iss. 1, pp. 43–50. doi: 10.1002/cyto.b.20542
15. Han S., Lin Y., Wu T., Salgado A., Mexhitaj I., Wuest S., Romm E., Ohayon J., Goldbach-Mansky R., Vanderver A., Marques A., Toro C., Williamson P., Cortese I., Bielekova B. Comprehensive immunophenotyping of cerebrospinal fluid cells in patients with neuroimmunological diseases. *J. Immunol.*, 2014, vol. 192, no. 6, pp. 2551–2563. doi: 10.4049/jimmunol.1302884
16. Ichiyama T., Maeba S., Suenaga N., Saito K., Matsubara T., Furukawa S. Analysis of cytokine levels in cerebrospinal fluid in mumps meningitis: comparison with echovirus type 30 meningitis. *Cytokine*, 2005, vol. 30, no. 5, pp. 243–247.

17. Ichiyama T., Kajimoto M., Matsushige T., Shiraishi M., Suzuki Y., Furukawa S. Mononuclear cell subpopulations in CSF and blood of children with bacterial meningitis. *J. Infect.*, 2009, vol. 58, no. 1, pp. 28–31. doi: 10.1016/j.jinf.2008.10.012
18. Kivisäkk P., Mahad D., Callahan M., Trebst C., Tucky B., Wei T., Wu L., Baekkevold E., Lassmann H., Staugaitis S., Campbell J., Ransohoff R. Human cerebrospinal fluid central memory CD4⁺ T cells: evidence for trafficking through choroid plexus and meninges via P-selectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, vol. 100, no. 14, pp. 8389–8394.
19. Kowarik M., Grummel V., Vemlinger S., Buck D., Weber M., Berthele A., Hemmer B. Immune cell subtyping in the cerebrospinal fluid of patients with neurological diseases. *J. Neurol.*, 2014, vol. 261, no. 1, pp. 130–143. doi: 10.1007/s00415-013-7145-2
20. Lepej S., Tesovic G., Sternak S., Jeren T. Naive and memory CD4⁺ T-cells in the cerebrospinal fluid of children with aseptic meningitis following measles-mumps-rubella vaccination and enteroviral meningitis. *Immunol. Invest.*, 2007, vol. 36, no. 3, pp. 321–335. doi: 10.1080/08820130601069855
21. Matsubara T., Matsuoaka T., Katayama K., Yoshitomi T., Nishikawa M., Ichiyama T., Furukawa S. Mononuclear cells and cytokines in the cerebrospinal fluid of echovirus 30 meningitis patients. *Scand. J. Infect. Dis.*, 2000, vol. 32, no. 5, pp. 471–474.
22. Maxeiner H., Rojewski M., Schmitt A., Tumani H., Bechter K., Schmitt M. Flow cytometric analysis of T cell subsets in paired samples of cerebrospinal fluid and peripheral blood from patients with neurological and psychiatric disorders. *Brain Behav. Immun.*, 2009, vol. 23, no. 1, pp. 134–142. doi: 10.1016/j.bbi.2008.08.003
23. Reindl M., Kuenz B., Berger T. B cells and antibodies in MS. In: *Molecular Basis of Multiple Sclerosis*. Springer, 2009, pp. 99–113. (Series: Results Probl. Cell Differ., vol. 51). doi: 10.1007/400_2008_16
24. Sakatoku H., Inoue M., Kojima M., Azuma E., Komada Y., Zhou Y., Zhang S., Sakurai M. 2',5'-oligoadenylate synthetase activity and T cell subset in the cerebrospinal fluid and peripheral blood of aseptic meningitis. *Acta Paediatr. Jpn.*, 1997, vol. 39, no. 1, pp. 48–53.
25. Schatorjé E., Gemen E., Driessen G., Leuvenink J., van Hout R., de Vries E. Paediatric reference values for the peripheral T cell compartment. *Scand. J. Immunol.*, 2012, vol. 75, no. 4, pp. 436–444. doi: 10.1111/j.1365-3083.2012.02671.x
26. Sulik A., Krotan A., Wojtkowska M., Oldak E. Increased levels of cytokines in cerebrospinal fluid of children with aseptic meningitis caused by mumps virus and echovirus 30. *Scand. J. Immunol.*, 2014, vol. 79, no. 1, pp. 68–72. doi: 10.1111/sji.12131
27. Svenningsson A., Andersen O., Edsbacke M., Stemme S. Lymphocyte phenotype and subset distribution in normal cerebrospinal fluid. *J. Neuroimmunol.*, 1995, vol. 63, pp. 39–46.
28. Svenningsson A., Hansson G., Andersen O., Andersson R., Patarroyo M., Stemme S. Adhesion molecule expression on cerebrospinal fluid T lymphocytes: evidence for common recruitment mechanisms in multiple sclerosis, aseptic meningitis, and normal controls. *Ann. Neurol.*, 1993, vol. 34, no. 2, pp. 155–161.
29. Tabata N., Oitani K., Morita K., Shogo Y., Sakurai N., Zhang Y., Komada Y. T cell subsets in peripheral blood and cerebrospinal fluid from children with aseptic meningitis. *Acta Paediatr. Jpn.*, 1994, vol. 36, no. 6, pp. 632–636.
30. Vrethem M., Dahle C., Ekerfelt C., Forsberg P., Danielsson O., Ernerudh J. CD4 and CD8 lymphocyte subsets in cerebrospinal fluid and peripheral blood from patients with multiple sclerosis, meningitis and normal controls. *Acta Neurol. Scand.*, 1998, vol. 97, no. 4, pp. 215–220.
31. Weber M., Hemmer B. Cooperation of B cells and T cells in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Results Probl. Cell Differ.*, 2010, vol. 51, pp. 115–126. doi: 10.1007/400_2009_21

Авторы:

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

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

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

Скрипченко Н.В., д.м.н., профессор, зам. директора по научной работе ФГБУ НИИ детских инфекций ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Вильниц А.А., к.м.н., старший научный сотрудник отдела нейроинфекций и органической патологии нервной системы ФГБУ НИИ детских инфекций ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

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

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

Authors:

Alekseeva L.A., PhD, MD (Biology), Head and Leading Researcher, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Scientific Research Institute of Children's Infections, St. Petersburg, Russian Federation; **Zheleznikova G.F.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Senior Researcher, Department of Clinical Laboratory Diagnostic, Scientific Research Institute of Children's Infection, St. Petersburg, Russian Federation;

Zhirkov A.A., Junior Researcher, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Scientific Research Institute of Children's Infections, St. Petersburg, Russian Federation;

Skripchenko N.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director of Science, Scientific Research Institute of Children's Infections, St. Petersburg, Russian Federation;

Vilnits A.A., PhD, Senior Researcher, Department of Neuroinfections and Organic Pathology of Nervous System, Scientific Research Institute of Children's Infections, St. Petersburg, Russian Federation;

Monakhova N.E., Researcher, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Scientific Research Institute of Children's Infections, St. Petersburg, Russian Federation;

Bessonova T.V., Researcher, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Scientific Research Institute of Children's Infections, St. Petersburg, Russian Federation.