

ВОЗМОЖНОСТИ ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКОГО ФЕНОТИПИРОВАНИЯ КЛЕТОК ЦЕРЕБРОСПИНАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ГНОЙНЫХ МЕНИНГИТАХ У ДЕТЕЙ

В.Е. Карев, Н.В. Скрипченко, И.А. Иващенко, Л.А. Алексеева, А.Н. Восканьянц
Научно-исследовательский институт детских инфекций ФМБА России, Санкт-Петербург

Possibilities of immunocytochemical phenotyping of cells in cerebrospinal fluid while children's bacterial meningitis
V.E. Karev, N.V. Skripchenko, I.A. Ivashchenko, L.A. Alekseeva, A.N. Voskaniants
Scientific Research Institute of Children's Infections of FMBA of Russia, Saint-Petersburg

Резюме. Проведено сравнительное динамическое клинико-иммуноморфологическое исследование цереброспинальной жидкости у детей, больных бактериальными гнойными менингитами менингококковой, гемофильной и пневмококковой этиологии. Выявлены закономерности относительного содержания CD3-позитивных лимфоцитов в составе клеточного эксудата цереброспинальной жидкости в зависимости от этиологии как в дебюте заболевания, так и при ее санировании. Показан разный уровень содержания CD3-позитивных лимфоцитов в цереброспинальной жидкости у детей, больных гнойными бактериальными менингитами менингококковой, гемофильной и пневмококковой этиологии как в дебюте заболевания, так и в периоде ранней реконвалесценции.

Ключевые слова: бактериальный гнойный менингит, цереброспинальная жидкость, иммуноцитохимический метод.

Введение

Бактериальные гнойные менингиты (БГМ) — группа заболеваний, характеризующихся развитием экссудативного гнойного воспалительного процесса в мягких мозговых оболочках. БГМ составляют до 38% среди нейроинфекционных заболеваний у детей [1]. Их актуальность определяется сохранением высоких показателей заболеваемости, вероятности развития эпидемий, например, при менингококковой инфекции, частым развитием витальных осложнений острого периода заболевания, а также формированием резидуальных последствий. Наибольшее эпидемиологическое значение имеют 3 возбудителя — *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* тип b (Hib), на долю которых приходится до 95% случаев БГМ у детей [2–5].

Патогенность этих микроорганизмов связана с разными повреждающими факторами, к которым относятся экзо-, эндотоксины и ферменты, наличие которых определяет особенности патогенеза, морфологической картины и клинических прояв-

Abstract. Comparative dynamic clinical and immunomorphological researches of children's cerebrospinal fluid were made during bacterial purulent meningitis (caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*). Regularities connected with presence of CD3 lymphocytes were discovered. They depended on etiology and phase of disease. Children with meningococcal meningitis, pneumococcal meningitis or hemophilic meningitis had different levels of CD3 lymphocytes in cerebrospinal fluid while different phases of disease.

Key words: bacterial purulent meningitis, cerebrospinal fluid, immunocytochemical method

лений. В частности, инвазии менингококка способствуют ферменты гиалуронидаза и нейраминидаза. Патогенность пневмококка обусловлена гемолизинами и лейкоцидином, повреждающими клетки; распространению микроорганизма способствуют пептидаза и гиалуронидаза, а М-белок и капсула обеспечивают устойчивость к фагоцитозу. Патогенность гемофильной палочки определяется капсульным полисахаридом (антифагоцитарные свойства) и эндотоксином [6].

Местные воспалительные реакции на самом раннем этапе внедрения возбудителя осуществляют экстренную локализацию патогена. Под влиянием факторов врожденного иммунитета к локальной и системной воспалительной реакциям подключается собственно иммунный ответ, который обеспечивается специализированными иммунными клетками — Т- и В-лимфоцитами [5]. Нейтрофилы являются тем неспецифическим ключевым звеном в цепи защитных реакций организма, которое во многом определяет возможность локализации возбудителя в месте инвазии, а их высокое содержа-

ние в ЦСЖ в дебюте заболевания характерно для БГМ любой этиологии. Лейкоциты первыми появляются в очаге повреждения тканей и активно стимулируют миграцию туда моноцитов, лимфоцитов, эозинофилов. Антимикробная активность нейтрофилов регулируется моноцитами и лимфоцитами, главным образом, посредством цитокинов. Принятая в настоящее время концепция иммунного ответа показывает, что секреция цитокинов ИЛ-2, ФНО-альфа ведет к активации Th1-типа ответа, оказывающего влияние на клеточный иммунитет, а секреция ИЛ-4, 6, 10 обеспечивает Th2-тип иммунного ответа и стимуляцию гуморального иммунитета [7–9].

Таким образом, изучение сложного многоступенчатого интрацеребрального клеточного и гуморального иммунного ответа при нейроинфекционных заболеваниях различной этиологии у детей, в том числе основанное на уточнении иммунофенотипа клеточного экссудата ЦСЖ, позволит выявить важнейшие звенья их патогенеза [10].

Цель исследования — уточнение характера интрацеребрального клеточного иммунного ответа при бактериальных гнойных менингитах менингококковой, пневмококковой и гемофильной этиологии у детей с использованием метода иммуноцитохимии.

Задачи исследования — определить уровень содержания Т-лимфоцитов (CD3) в цереброспинальной жидкости у детей, больных бактериальными гнойными менингитами менингококковой, пневмококковой и гемофильной этиологии в дебюте заболевания и в периоде ранней реконвалесценции.

Материалы и методы

Под наблюдением находились 22 ребенка в возрасте от 1 мес. до 3 лет, больных БГМ менингококковой ($n=8$), гемофильной ($n=11$) и пневмококковой ($n=3$) этиологии. Дети получали лечение в отделении нейроинфекций и органической патологии ЦНС и в отделении реанимации и интенсивной терапии НИИ детских инфекций г. Санкт-Петербурга за период с 2011 по 2013 г. Исследование ЦСЖ, полученной при люмбальной пункции в дебюте (1–2-е сутки) заболевания и в периоде ранней реконвалесценции (5–7-е сутки) заболевания, проводилось стандартными методами и методом иммуноцитохимии. Давление ЦСЖ оценивалось визуально по интенсивности вытекания ликвора. Оценивались цвет, прозрачность, подсчитывалось общее число клеток в камере Фукса-Розенталя с определением поли- и мононуклеаров, макрофагов, определялось содержание общего белка

фотокалориметрическим методом и глюкозы в ЦСЖ. Синдром воспалительных изменений ЦСЖ подтверждался наличием нейтрофильного плеоцитоза, протеиноррагии, бактериоррагии, снижением уровня глюкозы в ЦСЖ и, как правило, повышением ликворного давления.

Для проведения иммуноцитохимического (ИЦХ) исследования из полученной при люмбальной пункции ЦСЖ приготавливались цитологические препараты с использованием цитоцентрифуги Cytospin 4 (Thermo), позволяющей получить клеточный монослой на предметном стекле. После фиксации 70% этиловым спиртом цитологические препараты подвергались ИЦХ окрашиванию в аппарате для иммуноцитохимических и иммуногистохимических исследований Autostainer A360 (Thermo). Для проведения ИЦХ реакции использовались мышинные моноклональные антитела к CD3 (в разведении 1/100) производства Novocastra Lab (Великобритания), а также высокочувствительная и высокоспецифичная полимерная иммуногистохимическая система LabVision Quanto (Thermo). В качестве оптически плотной метки, визуализирующей продукт реакции антиген — антитело в клеточном материале, использовался диаминобензидин. После проведения ИЦХ реакции цитологические препараты докрашивали гематоксилином и заключали под покровные стекла.

Учет результатов ИЦХ исследования осуществлялся при микроскопии в проходящем свете в 5 полях зрения при суммарном увеличении микроскопа $\times 400$. CD3-позитивные клетки имели отчетливое коричневое окрашивание (рис. 1), тогда как остальные (негативные) клеточные элементы окрашивались гематоксилином в синий цвет.

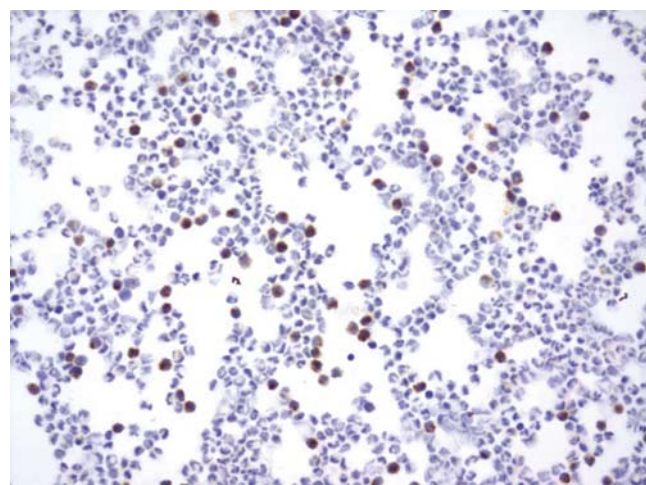


Рис. 1. CD3-позитивные лимфоциты (коричневое окрашивание) среди клеток ЦСЖ при БГМ менингококковой этиологии у ребенка 2 лет на 2-е сутки заболевания. Иммуноцитохимический метод, DAB. Ув. $\times 400$

Определялось среднее процентное соотношение клеток, экспрессирующих CD3 ко всем имеющимся в цитологическом препарате клеточным элементам. Имеющиеся в цитологическом препарате эритроциты при подсчете не учитывались. Достоверность различий между сравниваемыми параметрами оценивалась с помощью t-критерия Стьюдента. При обработке материала использовался пакет компьютерных программ STATISTIKA 5.5.

Результаты и обсуждение

В ходе проведенного исследования установлен различный уровень содержания клеточных элементов в ЦСЖ в зависимости от этиологии патологического процесса (рис. 2) при схожей клинической картине с преобладанием общеинфекционного, менингеального синдромов и наличием общемозговых или очаговых симптомов. В первые дни болезни наибольшее содержание клеточных элементов в ЦСЖ наблюдалось при БГМ, вызванных *Haemophilus influenzae* тип b (9242±8652 против 1021±711 кл в 1 мкл при менингококковом менингите и 492±438 кл в 1 мкл при пневмококковом менингите) с резким преобладанием нейтрофильных лейкоцитов. На 5–7-е сутки заболевания на фоне адекватной этиотропной и патогенетической терапии у большинства детей наблюдалась инволюция клинических симптомов, их состояние значительно улучшалось, и при контрольном исследовании ЦСЖ были выявлены закономерные значительные позитивные изменения в виде снижения плеоцитоза вне зависимости от этиологии ($p < 0,05$).

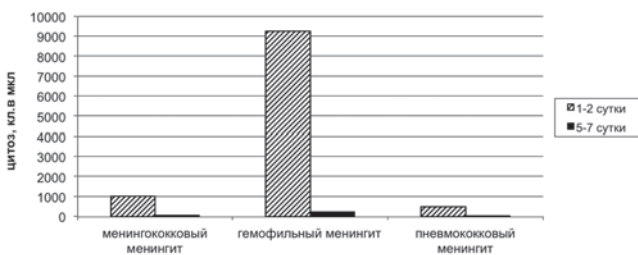


Рис. 2. Среднее содержание клеточных элементов ЦСЖ (к/л в 1 мкл) на 1–2-е сутки и 5–7-й день заболевания у детей, больных БГМ менингококковой, гемофильной и пневмококковой этиологии

При этом сохранялась тенденция к значительному преобладанию выраженности плеоцитоза у больных гемофильным менингитом (226±213 против 52±44 кл в 1 мкл при менингококковом менингите и 16 кл в 1 мкл ($n = 1$) при пневмококковом менингите).

Анализ среднего относительного содержания CD3-позитивных лимфоцитов в ЦСЖ показал, несмотря на высокие показатели σ , обусловлен-

ные небольшой выборкой обследованных пациентов, значительные отличия в зависимости от этиологии патологического процесса и от периода заболевания (таб.). Гемофильный менингит характеризовался крайне низким содержанием CD3-позитивных лимфоцитов в цереброспинальной жидкости в дебюте заболевания (2,29±1,25%) с достоверным возрастанием этого показателя к 5–7-му дню болезни до 22,23±17,34% ($p < 0,05$). Для менингококкового менингита был характерен умеренный уровень содержания (12,56±2,68%), а для пневмококкового менингита – высокий уровень содержания (25,22±7,11%) CD3-позитивных лимфоцитов в дебюте заболевания. К периоду ранней реконвалесценции, отмечалось значительное снижение плеоцитоза и наблюдалось значительное нарастание относительного содержания Т-лимфоцитов (CD3) в ЦСЖ и у больных менингококковым менингитом – 29,42±21,19% ($p < 0,05$), у больных пневмококковым менингитом – 35,23% ($n = 1$).

Таблица

Среднее содержание CD3-позитивных лимфоцитов в ЦСЖ в дебюте заболевания и в периоде ранней реконвалесценции в зависимости от этиологии у детей, больных БГМ

Этиология менингита		Количество образцов ЦСЖ	CD3 в ЦСЖ, %
Менингококковый	1–2-е сутки	$n = 6$	12,56±2,68 ^{# 1}
	5–7-е сутки	$n = 8$	29,42±21,19 ¹
Гемофильный	1–2-е сутки	$n = 8$	2,29±1,25 ^{# 2}
	5–7-е сутки	$n = 11$	22,23±17,34 ^{* 2}
Пневмококковый	1–2-е сутки	$n = 2$	25,22±7,11 [#]
	5–7-е сутки	$n = 1$	35,23 [*]

^{1,2}, #, * указывают на достоверные различия между сравниваемыми группами ($p < 0,05$ для M)

Заключение

Таким образом, различная степень выраженности плеоцитоза при менингококковом, пневмококковом и гемофильном менингитах, по всей видимости, обусловленная разными этиологическими факторами (*Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* тип b (Hib)) с их уникальными флогогенными свойствами, и является проявлением различного патогенеза этих нейроинфекционных заболеваний. Различный уровень содержания Т-лимфоцитов в соста-

ве ЦСЖ при менингококковом, гемофильном и пневмококковом менингите в дебюте заболевания и в периоде ранней реконвалесценции отражает во многом отличный характер интратекального иммунного клеточного ответа при этих нозологических формах и требует дальнейшего изучения содержания субпопуляций иммунокомпетентных клеток в ЦСЖ. Иммуноцитохимическое фенотипирование клеток ЦСЖ позволяет изучать патогенетические звенья интратекального клеточного иммунного ответа.

Литература

1. Сорокина, М.Н. Бактериальные гнойные менингиты у детей / М.Н. Сорокина, В.В. Иванова, Н.В. Скрипченко. — М.: Медицина, 2003. — 376 с.
2. Менингококковая инфекция у детей (эпидемиология, клиника, диагностика, терапия и профилактика) : Методические рекомендации / под ред. академика РАМН Ю.В. Лобзина. — СПб., 2009. — 60 с.
3. Лобзин, Ю.В. Бактериальные менингиты и герпетическая инфекция / Ю.В. Лобзин, В.В. Пилипенко, В.Е. Карев // Инфекционные болезни. — 2010. — Т. 8, № 4. — С. 5–9.
4. Скрипченко, Н.В. Бактериальные менингиты у детей : медицинское пособие. Н.В. Скрипченко [и др.]. — СПб., 2012. — 66 с.
5. Скрипченко, Н.В. Неотложные состояния при нейроинфекциях у детей (клиника, патогенез, диагностика, терапия) : медицинское пособие / Н.В. Скрипченко [и др.]. — СПб., 2013. — 72 с.
6. Цинзерлинг, В.А. Инфекционные поражения нервной системы / В.А. Цинзерлинг, М.Л. Чухловина. — СПб., 2011. — 584 с.
7. Железникова, Г.Ф. Варианты иммунопатогенеза острых инфекций у детей / Г.Ф. Железникова, В.В. Иванова, Н.Е. Монахова — СПб.: Фолиант, 2007. — 256 с.
8. Железникова, Г.Ф. Иммунопатогенез инфекционно-воспалительных заболеваний центральной нервной системы / Г.Ф. Железникова, Н.В. Скрипченко // Журнал инфектологии. — 2011. — Т. 3, № 2. — С. 28–32.
9. Рычкова, О.А. Дисфункции иммунной системы в патогенезе развития осложнений менингококковой инфекции у детей / О.А. Рычкова, Н.В. Скрипченко, Э.А. Кашуба // Инфекционные болезни. — 2009. — Т. 7, № 2. — С. 32–37.
10. Скрипченко, Н.В. Цереброспинальная жидкость и перспективы ее изучения / Н.В. Скрипченко [и др.] // Российский вестник перинатологии и педиатрии. — 2011. — Т. 56, № 6. — С. 88–98.

Авторский коллектив:

Карев Вадим Евгеньевич — заведующий лабораторией патоморфологии клиники Научно-исследовательского института детских инфекций ФМБА России, к.м.н.; тел.: +7-921-954-04-66, e-mail: vadimkarev@yandex.ru;

Скрипченко Наталья Викторовна — заместитель директора по научной работе Научно-исследовательского института детских инфекций ФМБА России, д.м.н., профессор; тел.: 8(812)234-10-38; e-mail: rmtc@mail.ru;

Иващенко Ирина Александровна — заочный аспирант Научно-исследовательского института детских инфекций ФМБА России; тел.: 8(812)234-10-38;

Алексеева Лидия Аркадьевна — руководитель отдела клинической лабораторной диагностики Научно-исследовательского института детских инфекций ФМБА России, д.б.н.; тел.: 8(812)234-34-18, e-mail: kldid@mail.ru;

Восканьянц Альбина Нерсесовна — научный сотрудник отдела тканевых и патоморфологических методов исследований Научно-исследовательского института детских инфекций ФМБА России, к.б.н.; тел.: 8(812)234-34-18.