

СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ ЦЕРЕБРОСПИНАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ДЕТЕЙ С ОСТРОЙ РЕСПИРАТОРНОЙ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ, ПРОТЕКАЮЩЕЙ С СИНДРОМОМ МЕНИНГИЗМА

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

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

Резюме. Актуальность изучения особенностей интратекального клеточного иммунного ответа на инфекции центральной нервной системы обусловлена ограниченностью имеющихся сведений о механизмах иммунной защиты мозга в норме и патологии. Использование в клинической лабораторной диагностике метода многоцветной проточной цитометрии позволило углубленно изучать клеточный состав биологических жидкостей, включая цереброспинальную жидкость (ЦСЖ). Однако в современной литературе данные о субпопуляционном составе лимфоцитов ЦСЖ единичны. Существенной проблемой остается получение референсных значений. Исследование состава пула лимфоцитов ЦСЖ у пациентов с подозрением на инфекционное поражение мозга, не подтвержденным проведенным обследованием, может явиться одним из возможных решений проблемы. К числу таких заболеваний относятся острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ), протекающие с синдромом менингизма. Цель работы – охарактеризовать субпопуляционный состав лимфоцитов ЦСЖ детей с ОРВИ без менингита для получения базисных (контрольных) значений в диагностике воспалительных заболеваний ЦНС. Исследован субпопуляционный состав лимфоцитов ЦСЖ 27 детей, переносящих ОРВИ с синдромом менингизма, методом проточной цитометрии на анализаторе FACSCalibur с использованием реагентов BD MultiTEST IMK Kit и последующей обработкой данных с помощью программы FlowJo. Исследовано содержание основных: Т-клеток (CD3⁺), Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺Th), цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺CTL), натуральных киллеров (CD3⁺CD16⁺CD56⁺NK), В-клеток (CD3⁺CD19⁺) и малых субпопуляций лимфоцитов: двойных позитивных (DP) (CD3⁺CD4⁺CD8⁺) и двойных негативных (DN) (CD3⁺CD4⁺CD8⁻) Т-клеток, NKT (CD3⁺CD16⁺CD56⁺), CD3⁺CD8^{bright}, CD3⁺CD8^{dim}, CD3⁺CD8⁺NK. Статистическая обработка данных выполнена с использованием стандартной программы GraphPad Prism 5. Среди основных популяций в ЦСЖ выявлено доминирование Т-лимфоцитов (96,2%) и их субпопуляций – CD4⁺Th (53,4%) и CD8⁺CTL (28,2%) – при незначительном количестве NK (2,2%) и В-лимфоцитов (0,7%). Среднее относительное содержание малых субпопуляций – DN или DP Т-клеток и NKT-клеток – составило 5,3, 4,0 и 9% соответственно. Выявлены возрастные особенности содержания основных и малых субпопуляций. С увеличением возраста

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

А.А. Жирков, Л.А. Алексеева, Г.Ф. Железникова,
Н.Е. Монахова, Т.В. Бессонова «Субпопуляционный
состав лимфоцитов цереброспинальной жидкости
детей с острой респираторной вирусной
инфекцией, протекающей с синдромом менингизма»
// Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 6.
С. 1033-1042.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1033-1042
© Жирков А.А. и соавт., 2019

For citation:

A.A. Zhirkov, L.A. Alekseeva, G.F. Zheleznikova,
N.E. Monakhova, T.V. Bessonova "Subsets of cerebrospinal
fluid lymphocytes in acute pediatric respiratory viral infection
with meningeal syndrome", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 6,
pp. 1033-1042.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1033-1042
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-6-1033-1042

у детей в ЦСЖ нарастает относительное количество CD3⁺T-клеток и CD4⁺Th (как и соотношение CD4/CD8) и снижается доля NK, а также DN и CD3⁺CD8^{dim}T-лимфоцитов. Полученные результаты характеризуют особенности лимфоцитарного пула ЦСЖ у детей без воспалительного процесса в ЦНС и могут быть использованы в качестве контроля (отсутствие признаков воспаления в ЦСЖ) при изучении иммунопатогенеза нейроинфекций и других воспалительных заболеваний ЦНС у детей разных возрастных групп.

Ключевые слова: проточная цитометрия, иммунофенотипирование, лимфоциты, цереброспинальная жидкость, ОРВИ, менингизм, дети

SUBSETS OF CEREBROSPINAL FLUID LYMPHOCYTES IN ACUTE PEDIATRIC RESPIRATORY VIRAL INFECTION WITH MENINGEAL SYNDROME

Zhirkov A.A., Alekseeva L.A., Zheleznikova G.F., Monakhova N.E., Bessonova T.V.

Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Current urgency of studying the intrathecal cellular immune response to infections of central nervous system is determined by limited knowledge on existing data about mechanisms of the brain immune protection in normal and diseased state. Implication of multi-colour flow cytometry in clinical laboratory diagnostics allowed to perform detailed studies of biological liquors, including cerebrospinal fluid (CSF). Currently, however, there are only scarce data on the lymphocyte subpopulations in CSF. Appropriate reference values remain a challenging issue. A study of CSF lymphocyte pool in absence of definite results at previous examination may be a potential way to resolve this problem. These clinical conditions include acute respiratory viral infections (ARVI), presenting with pseudomeningitis (meningism) syndrome. The aim of this work was to characterize the subsets of lymphocytes from CSF of the children with ARVI with the meningism symptoms in order to get basic (control) values for diagnostics of inflammatory brain diseases. We have studied subpopulation composition of the CSF lymphocytes form in 27 children with ARVI complicated by the meningism (pseudomeningitis) by means of flow cytometry using FACSCalibur analyzer with BD MultiTEST IMK Kit reagents. The data evaluation was performed with FlowJo software. We have studied relative contents of the main subsets, i.e., total T cells (CD3⁺); T helpers (CD3⁺CD4⁺Th); cytotoxic T cells (CD3⁺CD8⁺CTL); natural killers (CD3⁻CD16⁺CD56⁺NK); B cells (CD3⁻CD19⁺), and minor lymphocyte subpopulations: double-positive (DP) (CD3⁺CD4⁺CD8⁺); double-negative (DN) (CD3⁺CD4⁻CD8⁻) T cells; NKT (CD3⁺CD16⁺CD56⁺); CD3⁺CD8^{bright}, CD3⁺CD8^{dim}, CD3⁻CD8⁺NK. Statistical evaluation was carried out with standard GraphPad Prism 5 software. Among the main lymphocyte populations in CSF, T cell were predominant (96.2%), as well as their subpopulations, i.e., CD4⁺Th (53.4%), and CD8⁺CTL (28.2%), with low amounts of NK (2.2%) and B cells (0.7%). The mean relative content of minor subpopulations (DN or DP T cells, and NKT cells) was, respectively, 5.3, 4.0, and 9%. Age dependence was revealed for the contents of major and minor lymphocyte subsets. With advancing age of the children, the relative numbers of CD3⁺T and CD4⁺Th cells in CSF increase, as well as CD4/CD8 ratio, associated with decreased share of NK cells, like as DN and CD3⁺CD8^{dim}T cells. The results obtained are reflect some features of lymphocyte pool in CSF of the children without inflammatory process in CNS. Thus, they may be referred as control values (inflammation-free brain disorders) when studying immune pathogenesis of neuroinfections and other inflammatory diseases of CNS in the children from different age groups.

Keywords: flow cytometry, immunophenotyping, lymphocytes, cerebrospinal fluid, respiratory viral infections, meningism, children

Введение

Актуальность изучения интратекального клеточного иммунного ответа на инфекции центральной нервной системы (ЦНС) обусловлена ограниченностью имеющихся сведений о механизмах иммунной защиты мозга в норме и патологии. Особый интерес представляет исследование состава пула лимфоцитов цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) у пациентов с подозрением на инфекционное поражение мозга, не подтвержденным проведенным обследованием. К числу таких заболеваний относятся острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ), протекающие с синдромом менингизма. Диагностическая люмбальная пункция в таких случаях остается решающим фактором для исключения менингита при нормальном уровне общего белка и цитолиза в ликворе.

Оценка субпопуляционного состава лимфоцитов крови позволяет выявлять нарушения функций иммунной системы и в настоящее время используется для диагностики и изучения иммунопатогенеза различных заболеваний, включая инфекционные. В то же время исследование состава лимфоцитов ЦСЖ представляет определенные сложности, в связи с чем в современной литературе сведения о нем немногочисленны. Затруднения обусловлены небольшим количеством клеток и быстрой их гибелью при извлечении ликвора, что может приводить к артефактам, препятствуя получению объективных данных. Использование в клинической лабораторной диагностике метода многоцветной проточной цитометрии (ПЦ), усовершенствование технологии подготовки проб существенно улучшили результаты анализа клеточного состава ЦСЖ [13] и позволили охарактеризовать субпопуляционный состав лимфоцитов ликвора при ряде заболеваний ЦНС, включая инфекционные [1, 2, 5, 11].

Существенной проблемой остается получение референсных значений субпопуляционного состава лимфоцитов ЦСЖ. Так, Alvermann S. и соавт., подчеркивая важность иммунофенотипирования субпопуляций лимфоцитов ЦСЖ при изучении патогенеза воспалительных заболеваний мозга, констатируют, что в большинстве публикаций отсутствуют контрольные физиологические параметры [5]. Действительно, в литературе имеются лишь единичные работы, посвященные исследованию состава пула лимфоцитов с помощью ПЦ у практически здоровых взрослых доноров. В исследовании Svenningsson A. и соавт. приведены данные фенотипирования пула лимфоцитов ЦСЖ 18 здоровых доноров в возрасте от 22 до 32 лет [14]. Установлено доминирование CD3⁺T-клеток (97%) при небольшом количестве CD3-негативных популяций: нормальных килле-

ров (NK) и В-лимфоцитов. В работе de Graaf M.T. и соавт. методом ПЦ определены значения абсолютного содержания лейкоцитов в образцах ЦСЖ, полученных при проведении спинальной анестезии у 84 взрослых пациентов без неврологических заболеваний [9]. Авторами также установлено доминирование CD3⁺T-клеток, среди которых преобладали CD4⁺T-хелперы (Th), при относительном содержании В-клеток менее 1%. В исследовании Балмасовой И.П. и соавт. при изучении патогенеза острых нейроинфекций в качестве группы сравнения были использованы данные фенотипирования лимфоцитов ЦСЖ 32 условно здоровых взрослых пациентов без воспалительных изменений в ЦСЖ [2]. В данной работе авторами также обнаружено превалирование в ЦСЖ Т-клеток (в среднем 83,2%) при относительно высоком содержании NK- (8,95%) и В-клеток (5%). Исследование ликвора у практически здоровых детей невозможно из-за строго ограниченных показаний к спинномозговой пункции.

Помимо основных субпопуляций (CD3⁺T-клетки, CD4⁺Th, CD8⁺CTL, CD3⁺CD16⁺CD56⁺NK, В-клетки), в настоящее время исследуют патогенетическое и диагностическое значение малых субпопуляций лимфоцитов, таких как CD3⁺CD16⁺CD56⁺NKT (Natural killer T cells), CD3⁺CD4⁻CD8⁻DN (Double Negative) и CD3⁺CD4⁺CD8⁺DP (Double Positive) Т-лимфоциты, и других, с особым фенотипом и функциями [4]. У DP-лимфоцитов установлен цитотоксический потенциал [12] и иммуносупрессорная активность [8]. DN Т-лимфоциты в зависимости от фенотипа также проявляют разнонаправленные функции – от усиления до супрессии антиген-специфического Т-клеточного ответа [7]. На основе интенсивности флуоресценции установлена гетерогенность популяции экспрессирующих CD8 Т-клеток – с высокой (CD8^{bright}) и низкой (CD8^{dim}) интенсивностью, при этом CD3⁺CD8^{bright} составляют около 80% всей популяции CD3⁺CD8⁺T-клеток [6]. CD3⁺CD8^{dim}T-лимфоциты отличаются от CD3⁺CD8^{bright} меньшей эффективностью в элиминации вируса, что показано на примере острой HIV-инфекции у взрослых [10]. Кроме CD8⁺CTL, корецептор CD8 могут экспрессировать с низкой интенсивностью CD3⁻ лимфоциты (CD3⁻CD8^{dim}), которые одновременно экспрессируют маркеры NK CD16 и CD56, что позволяет рассматривать эти клетки как одну из субпопуляций NK [6]. В доступной нам литературе данных исследования основных и малых субпопуляций лимфоцитов в ЦСЖ у детей без патологии ЦНС обнаружено не было.

Цель настоящей работы – охарактеризовать субпопуляционный состав лимфоцитов цере-

броспинальной жидкости детей с ОРВИ без менингита для получения базисных (контрольных) значений в диагностике воспалительных заболеваний ЦНС.

Материалы и методы

Проведено однократное (в острый период) клинико-лабораторное обследование ЦСЖ 27 детей (13 мальчиков, 14 девочек) в возрасте от 2 до 18 лет с диагнозом «ОРВИ с синдромом менингизма». Спинномозговую пункцию проводили в большинстве случаев на 1-4-й ($n = 21$), реже на 5-10-й ($n = 6$) день от начала болезни.

Стандартное исследование ликвора включало определение общего белка и цитоза с дифференциацией на моно- и полинуклеарные лейкоциты (реагенты Диахим-Ликвор, НПФ Абрис+, Санкт-Петербург). Иммунофенотипирование лимфоцитов ЦСЖ осуществляли на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Beckton Dickenson, BD, США) с использованием программы MultiSET (BD) в автоматическом режиме. Образцы ликвора центрифугировали в течение 5 минут при 1800 об/мин на центрифуге Hetaeus Labofuge 300 (Германия) и ресуспендировали осадок в 100 мкл ЦСЖ. Для исследования субпопуляционного состава ($CD3^+T$ -клетки, $CD3^+CD4^+T$ -хелперы (Th), $CD3^+CD8^+$ цитотоксические Т-клетки (CTL), $CD3^+CD4^-CD8^-$ (DN), $CD3^+CD4^+CD8^+$ (DP), $CD3^+CD8^{bright}$, $CD3^+CD8^{dim}$, $CD3^+CD16^+CD56^+$ (NKT), $CD3^-CD8^+NK$, $CD3^-CD16^+CD56^+NK$, $CD3^-CD19^+B$ -клетки) использована тест-система BD MultiTEST IMK Kit (cat. № 350503). Относительное содержание субпопуляций рассчитано из числа всех лимфоцитов ЦСЖ с применением программного обеспечения Microsoft Excel. Абсолютное содержание субпопуляций лимфоцитов рассчитывали согласно данным цитоза, принимая количество мононуклеарных клеток за 100%. Статистическая обработка данных выполнена с использованием стандартной программы GraphPad Prism 5. Результаты представлены в виде медианы и межквартильного размаха — $Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})$. Для оценки достоверности различий выборки использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. При проведении корреляционного анализа применяли коэффициент корреляции Спирмена.

Результаты

Результаты стандартного анализа ЦСЖ не выявили отклонений от общепринятых возрастных норм [3], что позволило исключить наличие менингита. Медиана и межквартильный размах содержания общего белка составили 0,20 (0,14-0,28) г/л, цитоза — 2,0 (1,3-2,9) кл/мкл.

Для комплексной оценки основных и малых субпопуляций лимфоцитов ЦСЖ обработка данных выполнена в программе FlowJo в алгоритме, представленном на рисунке 1. На основе экспрессии CD45 и параметра бокового светорассеяния (SSC) выделяли область « $CD45^{+++}$ », соответствующую по структуре и размерам лимфоцитам (рис. 1А). Далее на основе параметра бокового (SSC) и прямого (FSC) светорассеяния среди клеток области « $CD45^{+++}$ » отделяли область «Lymphocytes», соответствующую скоплениям одиночных клеток (рис. 1Б). В рамках популяции «Lymphocytes» выделяли $CD3^+T$ -клетки (правый пик гистограммы, рис. 1В) и $CD3^-$ лимфоциты (левый пик гистограммы, рис. 1В). Среди Т-клеток на основе экспрессии CD4 и CD8 выделяли $CD4^+Th$ (правый нижний квадрант, рис. 1Г), $CD8^+CTL$ (верхний левый квадрант, рис. 1Г), DP (правый верхний квадрант, рис. 1Г) и DN (левый нижний квадрант, рис. 1Г). Для разделения субпопуляции клеток, экспрессирующих CD8, использовали маркеры CD3 и CD8: $CD3^+CD8^{bright}$, $CD3^+CD8^{dim}$ (правый верхний квадрант, рис. 1Д) и $CD3^-CD8^+NK$ (левый верхний квадрант, рис. 1Д). Субпопуляции NK (левый верхний квадрант, рис. 1Е) и NKT (правый верхний квадрант, рис. 1Е) выделяли на основе экспрессии CD3 и $CD16^+CD56$. В-клетки выделяли на основе экспрессии CD19 (левый верхний квадрант, рис. 1Ж).

Анализ относительного содержания в ЦСЖ основных субпопуляций выявил доминирование Т-лимфоцитов и субпопуляции $CD4^+Th$ над $CD8^+CTL$, а также малое количество NK- и В-лимфоцитов, составлявшее в сумме в среднем менее 3% от общего числа лимфоцитов (табл. 1), что согласуется с данными, полученными при исследовании ликвора практически здоровых взрослых [9, 14]. Среди субпопуляций $CD8^+CTL$ $CD3^+CD8^{bright}$ преобладали над Т-клетками, экспрессирующими CD8 с низкой интенсивностью — $CD3^+CD8^{dim}$ (см. табл. 1). Изучение малых субпопуляций показало, что относительное содержание ряда из них в условно нормальном ликворе выше, чем содержание двух основных субпопуляций (В-клеток и NK). Так, число NKT-клеток в среднем составляло 9%, DN Т-лимфоцитов — 5,3%, а DP Т-лимфоцитов — 4,0%. Очевидно, полученные результаты свидетельствуют о значимой роли субпопуляций NKT, DN и DP Т-клеток для поддержания интрацеребрального иммунного гомеостаза в условиях ОРВИ у детей.

Выявлен значительный разброс относительного содержания всех исследованных субпопуляций. Так, доля $CD4^+Th$ колебалась в широком диапазоне от 22,9% (min) до 86,1% (max) от числа

всех лимфоцитов, а CD8⁺CTL – от 11,1% (min) до 67,8% (max). При расчете индивидуального коэффициента соотношения Th/CTL (CD4/CD8) установлено, что в абсолютном большинстве случаев в ЦСЖ превалировали Th, и только в 2 случаях (7,4%) CTL преобладали над Th. Среди исследованных образцов ЦСЖ в двух случаях выявлено увеличение содержания НК- и В-клеток (в сумме выше 10%) с соответствующим снижением числа Т-лимфоцитов (< 90%). Дисперсия содержания большинства исследованных субпопуляций лимфоцитов ликвора у детей обследованной группы может отражать возрастные

особенности функционирования иммунной системы мозга.

В связи с этим был проведен корреляционный анализ показателей относительного и абсолютного содержания субпопуляций лимфоцитов с возрастом пациентов. Обнаружена достоверная положительная корреляция между возрастом и относительным содержанием в ЦСЖ CD3⁺Т-клеток ($r = 0,442$; $p = 0,021$) и CD4⁺Th ($r = 0,615$; $p = 0,001$), в том числе с абсолютным количеством CD4⁺Th ($r = 0,472$; $p = 0,013$), тогда как с относительным содержанием CD8⁺CTL выявлена отрицательная связь ($r = -0,449$; $p = 0,019$).

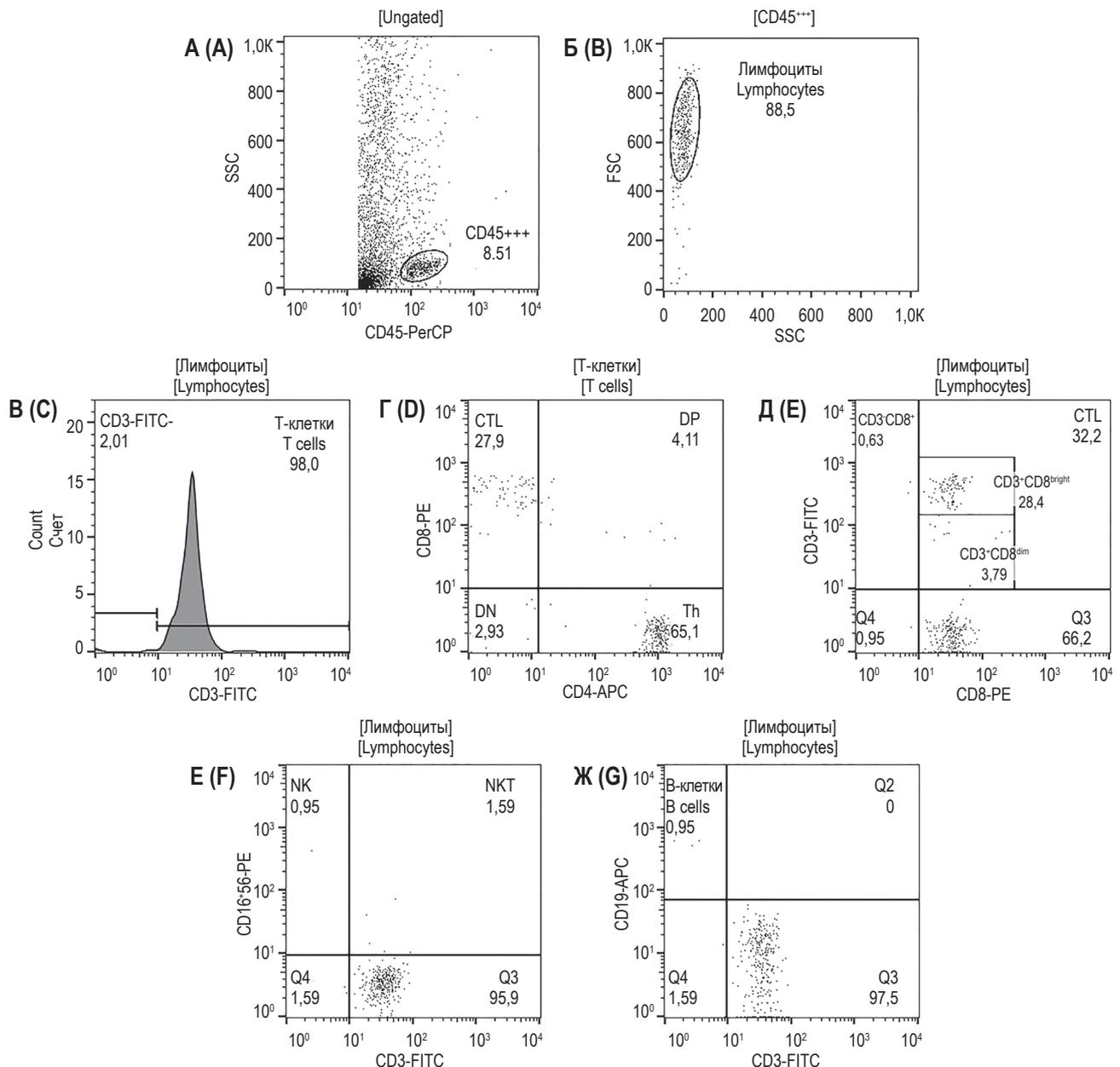


Рисунок 1. Последовательность выделения основных и малых субпопуляций лимфоцитов (подробное описание в тексте)

Figure 1. Isolation sequence of major and minor lymphocyte subpopulations (detailed description is given in the text)

ТАБЛИЦА 1. ОТНОСИТЕЛЬНОЕ И АБСОЛЮТНОЕ СОДЕРЖАНИЕ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ ЦЕРЕБРОСПИНАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ДЕТЕЙ С ОСТРОЙ РЕСПИРАТОРНОЙ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ, ПРОТЕКАЮЩЕЙ С СИНДРОМОМ МЕНИНГИЗМА, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. RELATIVE AND ABSOLUTE CONTENT OF LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN CEREBROSPINAL FLUID OF CHILDREN WITH ACUTE RESPIRATORY VIRAL INFECTION TAKING THE COURSE WITH THE SYNDROME OF MENINGISM, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Основные и малые субпопуляции Major and minor subpopulations	Содержание Content	
	Относительное количество Relative content (%)	Абсолютное количество (10 ⁶ /л) Absolute amount (10 ⁶ /l)
Т-клетки T cells (CD3 ⁺ CD45 ⁺)	96,2 (94,3-97,6)	1,6 (0,9-2,0)
Th (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45 ⁺)	53,4 (47,0-61,6)	0,8 (0,4-1,2)
CTL (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45 ⁺)	28,2 (20,1-34,8)	0,4 (0,2-0,7)
CD3 ⁺ CD8 ^{bright} CD45 ⁺	23,8 (16,0-33,6)	0,38 (0,21-0,66)
CD3 ⁺ CD8 ^{dim} CD45 ⁺	7,3 (5,1-12,9)	0,11 (0,07-0,19)
DN (CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻ CD45 ⁺)	5,3 (2,4-8,2)	0,05 (0,04-0,16)
DP (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD45 ⁺)	4,0 (2,8-7,9)	0,06 (0,04-0,10)
NKT (CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD3 ⁺ CD45 ⁺)	9,3 (5,9-16,9)	0,16 (0,05-0,24)
NK (CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD3 ⁻ CD45 ⁺)	2,2 (1,0-3,1)	0,03 (0,01-0,05)
CD3 ⁻ CD8 ⁺ CD45 ⁺ NK	0,3 (0,0-1,2)	0,01 (0,00-0,01)
В-клетки B cells (CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD45 ⁺)	0,7 (0,2-1,7)	0,01 (0,00-0,03)
Th/CTL	2,0 (1,5-2,6)	—

Коэффициент Th/CTL (CD4/CD8) прямо коррелировал с возрастом детей ($r = 0,525$; $p = 0,005$). Прослеживалась сильная отрицательная корреляция с возрастом числа (%) CD4⁺CD8⁻DN Т-лимфоцитов ($r = -0,634$; $p = 0,0001$), а также всех CD3⁺ клеток ($r = -0,444$; $p = 0,020$) и NK ($r = -0,512$; $p = 0,006$). Таким образом, с возрастом у детей, переносящих ОРВИ, среди лимфоцитов ЦСЖ нарастает доля CD3⁺Т-клеток и CD4⁺Th (как и соотношение CD4/CD8) с уменьшением числа CD8⁺CTL. Снижается также доля CD4⁺CD8⁻DN Т-клеток, а также CD3⁻ клеток за счет NK (но не В-лимфоцитов).

Результаты корреляционного анализа явились основанием для разделения детей на 3 группы по возрасту, согласно общепринятой классификации возрастных периодов развития человека

(табл. 2). Полученные результаты показали рост субпопуляции CD3⁺CD8^{bright} и тенденцию к росту субпопуляции DP Т-лимфоцитов ($p = 0,054$) при, напротив, снижении содержания CD3⁺CD8^{dim} и DN Т-лимфоцитов у детей раннего школьного возраста (6-11 лет, 2-я группа) в сравнении с детьми дошкольного возраста (2-5 лет, 1-я группа). Анализ показателей у детей подросткового возраста (12-18 лет, 3-я группа) выявил тенденцию к повышенному содержанию в ЦСЖ CD3⁺Т-лимфоцитов ($p = 0,06$) и CD4⁺Th ($p < 0,05$) в сравнении с детьми 1-й и 2-й групп. Доля CD3⁺CD8^{bright} у подростков оказалась сопоставима с показателями в 1-й группе и заметно снижена в сравнении со 2-й ($p = 0,068$). Соотношение CD4⁺Th/CD8⁺CTL у детей 3-й группы выше, чем у детей 1-й группы ($p < 0,05$) и, возможно, 2-й ($p = 0,08$).

ТАБЛИЦА 2. ОТНОСИТЕЛЬНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ОСНОВНЫХ И МАЛЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ ЦЕРЕБРОСПИНАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ДЕТЕЙ С ОСТРОЙ РЕСПИРАТОРНОЙ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ С СИНДРОМОМ МЕНИНГИЗМА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВОЗРАСТА, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. RELATIVE CONTENT OF MAJOR AND MINOR LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN CEREBROSPINAL FLUID OF CHILDREN WITH ACUTE RESPIRATORY VIRAL INFECTIONS WITH THE SYNDROME OF MENINGISM DEPENDING ON THE AGE, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Основные и малые субпопуляции Major and minor subpopulations	Содержание Content		
	1 группа 2-5 лет 1 st group 2-5 years n = 7	2 группа 6-11 лет 2 nd group 6-11 years n = 9	3 группа 12-18 лет 3 rd group 12-18 years n = 11
Т-клетки T cells (CD3 ⁺ CD45 ⁺)	95,5 (90,5-96,3)	95,1 (92,7-96,3)	97,2 (94,8-98,2)
Th (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45 ⁺)	51,8 (40,2-53,1)	51,1 (40,8-57,9)	61,4* ** (53,8-73,0)
CTL (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45 ⁺)	33,6 (25,8-36,3)	31,8 (24,8-36,1)	24,3 (14,8-30,2)
CD3 ⁺ CD8 ^{bright} CD45 ⁺	20,8 (12,3-27,9)	30,0* (22,8-42,0)	23,8 (15,3-33,6)
CD3 ⁺ CD8 ^{dim} CD45 ⁺	12,4 (9,0-13,6)	7,1* (4,8-8,9)	7,1 (4,3-14,9)
DN (CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺ CD45 ⁺)	10,7 (8,8-14,6)	5,4* (4,7-7,0)	3,0* (1,6-5,4)
DP (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD45 ⁺)	2,8 (1,9-4,0)	6,1 (3,6-10,8)	3,8 (3,1-9,1)
NKT (CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD3 ⁺ CD45 ⁺)	11,9 (7,7-16,3)	7,2 (5,6-14,6)	8,9 (3,0-19,6)
NK (CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD3 ⁻ CD45 ⁺)	3,1 (2,2-6,8)	2,9 (0,6-3,2)	1,5* (1,0-2,1)
CD3 ⁻ CD8 ⁺ CD45 ⁺ NK	1,1 (0,2-1,3)	0,3 (0,0-1,0)	0,5 (0,0-1,0)
В-клетки B cells (CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD45 ⁺)	1,0 (0,5-1,7)	1,0 (0,3-4,1)	0,46 (0,06-1,61)
Th/CTL	1,46 (1,04-2,23)	1,51 (1,18-2,33)	2,45* (1,75-5,01)

Примечание. * – отличие от показателей 1-й группы, ** – отличие от показателей 2-й группы (уровень достоверности $p < 0,05$, критерий Манна-Уитни).

Note. *, difference from the indicators of the 1st group; **, difference from the indicators of the 2nd group (confidence level $p < 0.05$, Mann-Whitney test).

Кроме того, в ЦСЖ детей 3-й группы достоверно ниже содержание NK и DN Т-лимфоцитов в сравнении с детьми 1-й, а DN, по-видимому, и с детьми 2-й группы ($p = 0,059$). Анализ абсолютного содержания клеток всех субпопуляций показал, что в ЦСЖ детей раннего школьного и подросткового возраста (2-я и 3-я группы) количество DP Т-лимфоцитов достоверно выше, чем у детей младшей (1-й) группы, а пул CD4⁺Th у подростков заметно больше, чем у детей младше 12 лет ($p = 0,057$ при сравнении с 1-й группой).

Обсуждение

Инtrateкальный пул лимфоцитов представляет собой важный фактор в обеспечении гомеостаза мозга в норме и при патологии. Мозг обладает собственными защитными механизмами, одним из которых является наличие в ЦСЖ иммунокомпетентных клеток, включая Т-лимфоциты [14]. В настоящей работе подробно охарактеризован субпопуляционный состав лимфоцитов ЦСЖ у детей с ОРВИ без вовлечения ЦНС. Помимо

оценки основных субпопуляций, давно и прочно вошедших в практику клинической лабораторной диагностики, проведена оценка относительного и абсолютного содержания малых субпопуляций с помощью дополнительного алгоритма гейтирования (gating) с использованием программы FlowJo. Полученные результаты частично согласуются с данными литературы о составе лимфоцитов ЦСЖ у практически здоровых взрослых либо пациентов без заболеваний ЦНС [9, 14]. В то же время выявлены некоторые отличия. В частности, соотношение Th/CTL лимфоцитов у здоровых доноров было несколько выше (3,16) [14] в сравнении с полученным в настоящем исследовании (2,0). Соотношение Th/CTL в работе Балмасовой И.П. и соавт. было еще более смещено в сторону Th (коэффициент составлял около 4) [2], что сопоставимо с результатами Svenningsson A. и соавт. [14] и в 2 раза выше значения, полученного в настоящем исследовании (см. табл. 1). По-видимому, превалирование CD4⁺Th над CD8⁺CTL в ЦСЖ усиливается с возрастом, что показано нами в возрастном интервале от 2 до 18 лет (см. табл. 2). Содержание НКТ в ликворе детей с ОРВИ составляло в среднем 9% (см. табл. 1), что превышает колебания числа НКТ в ЦСЖ практически здоровых взрослых (от 2,7 до 4,2%) [14].

Выявленные возрастные особенности содержания в ЦСЖ основных (CD4⁺Th, NK) и малых (CD3⁺CD8^{bright}, CD3⁺CD8^{dim}, DN Т-лимфоциты) субпопуляций лимфоцитов, по-видимому, отражают этапы созревания иммунной системы

мозга. Для детей младшего возраста, переносящих ОРВИ, характерно присутствие в ЦСЖ большего числа клеток врожденного иммунитета (NK, CD3⁺CD8⁺NK), а также клеток переходного фенотипа (DN и CD3⁺CD8^{dim}). С возрастом содержание этих клеток в ЦСЖ уменьшается, и, по-видимому, у детей подросткового возраста показатели становятся сопоставимыми с таковыми у практически здоровых взрослых.

Заключение

Таким образом, использование многоцветной проточной цитометрии позволило охарактеризовать субпопуляционный состав лимфоцитов ЦСЖ детей, переносящих ОРВИ с синдромом менингизма. Благодаря использованному алгоритму гейтирования установлено относительное и абсолютное содержание в ликворе как основных, так и малых субпопуляций лимфоцитов, что способствует расширению представлений о роли различных субпопуляций в осуществлении иммунной защиты мозга при острых вирусных инфекциях. Полученные данные могут быть использованы в качестве контроля (отсутствие признаков воспаления в ЦСЖ) при изучении иммунопатогенеза нейроинфекций и других воспалительных заболеваний ЦНС у детей разных возрастных групп.

Благодарности

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

Список литературы / References

1. 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 иммунитет = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2016, Vol. 6, no. 1, pp. 33-44. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2016-1-33-44.
2. 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 infeksionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases*, 2014, Vol. 19, no. 5, pp. 17-22. (In Russ.)]
3. Скрипченко Н.В., Алексеева Л.А., Железникова Г.Ф. Ликвор и его клиническое значение при инфекционных заболеваниях нервной системы // *Педиатр*, 2011. Т. 2, № 3. С. 21-31. [Skripchenko N.V., Alekseeva L.A., Zheleznikova G.F. Liquor and its clinical meaning in infectious diseases of nervous system. *Pediatr = Pediatrician*, 2011, Vol. 2, no. 3, pp. 21-31. (In Russ.)]
4. 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. *Meditsinskiy alfavit = Medical Alphabet*, 2015, Vol. 2, no. 8, pp. 44-51. (In Russ.)]
5. Alvermann S., Hennig C., Olaf S., Heinz W., Stangel M. Immunophenotyping of cerebrospinal fluid cells in multiple sclerosis in search of biomarkers. *JAMA Neurology*, 2014, Vol. 71, no. 7, pp. 905-912.

6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. de Graaf 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.
10. Eller M.A., Goonetilleke N., Tassaneeritthep 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.
11. Ichiyama T., Kajimoto M., Matsushige T., Shiraiishi 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.
12. 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.
13. Subirá D., Castañón S., Aceituno E., Hernández J., Jiménez-garófano C., Jiménez A., Jiménez A.M., Román A., Orfao A. Flow cytometric analysis of cerebrospinal fluid samples and its usefulness in routine clinical practice. *Am. J. Clin. Pathol.*, 2002, Vol. 117, no. 6, pp. 952-958.
14. Svenningsson A., Andersen O., Edsbacke M., Stemme S. Lymphocyte phenotype and subset distribution in normal cerebrospinal fluid. *J. Neuroimmunol.*, 1995, Vol. 63, no 1, pp. 39-46.

Авторы:

Жирков А.А. — младший научный сотрудник отдела клинической лабораторной диагностики ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия
Алексеева Л.А. — д.б.н., руководитель, ведущий научный сотрудник отдела клинической лабораторной диагностики ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия
Железникова Г.Ф. — д.м.н., профессор, старший научный сотрудник отдела клинической лабораторной диагностики ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Zhirkov A.A., Junior Research Associate, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation
Alekseeva L.A., PhD, MD (Biology), Head, Leading Research Associate, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation
Zheleznikova G.F., PhD, MD (Medicine), Professor, Senior Research Associate, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Монахова Н.Е. — научный сотрудник отдела клинической лабораторной диагностики ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Бессонова Т.В. — научный сотрудник отдела клинической лабораторной диагностики ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Monakhova N.E., Research Associate, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Bessonova T.V., Research Associate, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 10.04.2019
Принята к печати 06.05.2019

Received 10.04.2019
Accepted 06.05.2019