

УДК 6181-076 -011 367: 612. 017. 1

ОСОБЕННОСТИ ВРОЖДЕННОГО И АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА У НОВОРОЖДЕННЫХ С ГЕНЕРАЛИЗОВАННОЙ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Левкович А. Ю., Афонин А. А.

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский институт акушерства и педиатрии» Министерства здравоохранения РФ, Ростов-на-Дону, Россия (344012, г. Ростов-на-Дону, ул. Мечникова, 43), e-mail: xlma@mail.ru.

Проведено клинико-лабораторное обследование 47 новорожденных с генерализованной цитомегаловирусной инфекцией (ЦМВИ) в раннем неонатальном периоде (основная группа). У 29 детей имела место генерализованная ЦМВИ с полной клинической симптоматикой (I подгруппа), у 18 детей – ЦМВИ с неполной клинической симптоматикой (II подгруппа). Контрольную группу составили 26 клинически здоровых новорожденных. Изучены: экспрессия TLR-2 и TLR-6 на моноцитах периферической крови, частота полиморфизма Ser249Pro гена TLR-6, взаимосвязь про-и противовоспалительных цитокинов и хемокинов (IFN- γ , IFN- α , IL-8, IL-4, MCP-1) у новорожденных с различными формами генерализованной ЦМВИ. Выявлено, что дисбаланс факторов врожденного и адаптивного иммунного ответа приводит к изменению их взаимодействия, обуславливающего усиление вирусной репликации, сдвиг дифференцировки Т-хелперов в направлении Th2, не обеспечивающих формирование эффективного противовирусного иммунного ответа, что является одним из механизмов развития генерализованной ЦМВИ.

Ключевые слова: внутриутробная цитомегаловирусная инфекция, цитокины, врожденный иммунитет, адаптивный иммунитет.

FEATURES OF THE INNATE AND ADAPTIVE IMMUNITY IN INFANTS WITH GENERALIZED CYTOMEGALOVIRUS INFECTION

Levkovich A. Y., Afonin A. A.

FGSFO "Rostov Research Institute of Obstetrics and Pediatrics" of the Ministry of Health of the Russia, Rostov-on-Don Russia (344012, Rostov-on-Don, st. Mechnikov, 43), e-mail: xlma@mail.ru.

Clinical and laboratory examination of 47 infants with generalized cytomegalovirus infection (CMV) in the early neonatal period is conducted (main group). In 29 children (I subgroup) had generalized CMV infection with complete clinical symptomatology, in 18 children (II subgroup) - CMV infection with incomplete clinical symptoms. The control group consisted of 26 were clinically healthy newborns. The expression of TLR-2, TLR-6 in peripheral blood monocytes, frequency polymorphism Ser249Pro gene TLR-6, interrelation of pro-and anti-inflammatory cytokines and chemokines (IFN- γ , IFN- α , IL-8, IL-4, MCP-1) at newborns with various forms of generalized CMV infection are studied. It is revealed that an imbalance of factors innate and adaptive immune response leads to a change in the interaction responsible for the enhancement of viral replication, shift differentiation of T-helper cells toward Th2, not ensuring the formation of an effective antiviral immune response, which is one of the mechanisms of generalized CMV infection.

Key words: fetal cytomegalovirus infection, innate immunity, adaptive immunity, cytokines.

Введение

Важнейшей медико-социальной проблемой современной педиатрии является цитомегаловирусная инфекция (ЦМВИ), что обусловлено тяжестью течения заболевания, склонностью к генерализации, высокой частотой поражения ЦНС, трудностью своевременной диагностики и терапии [7, 8]. При этом актуальность проблемы обусловлена и тем, что у 50 % детей, перенесших тяжелые формы ЦМВИ, развиваются серьезные нарушения здоровья, нередко приводящие к инвалидизации и снижению качества жизни в целом [1, 2, 9]. Учитывая, что реализация инфекционного процесса определяется

патогенностью возбудителей инфекции и эффективностью защитных сил организма, важная роль отводится состоянию иммунной системы [5].

Известно, что у новорожденных детей имеет место незрелость механизмов адаптивного компонента иммунной системы – отсутствует иммунологическая память и снижена способность к формированию специфических антител к патогенам, поэтому защита от инфекции зависит главным образом от состояния врожденного иммунитета и их гуморальных компонентов [3]. При этом реализация специфичности врожденной иммунной системы ложится на семейство TLR-рецепторов, связывание которых микробными продуктами приводит к продукции цитокинов, что в дальнейшем определяет характер, направление и интенсивность адаптивного иммунного ответа [4]. Несмотря на многочисленные исследования, посвященные данной проблеме, многие вопросы до настоящего времени остаются нерешенными.

Целью исследования явилось выявление новых патогенетических механизмов развития генерализованной цитомегаловирусной инфекции у новорожденных детей.

Материал и методы исследования

Изучены клиничко-лабораторные данные 47 новорожденных с генерализованной ЦМВИ в раннем неонатальном периоде (основная группа). Согласно классификации Орехова К. В. (2002) дети с генерализованной ЦМВИ были разделены на две подгруппы: I подгруппа (29 детей) – типичная генерализованная форма с полной клинической симптоматикой, II подгруппа (18 детей) – типичная генерализованная форма с неполной клинической симптоматикой. Контрольную группу составили 26 клинически здоровых новорожденных, родившихся у женщин с физиологическим течением беременности и родов.

Диагноз внутриутробной ЦМВИ ставился на основании клинической картины заболевания, выявления ДНК ЦМВ в крови и в моче, нарастания титров специфических IgG к ЦМВ в динамике, обнаружения IgM в сыворотке крови у ребенка.

Определение экспрессии TLR-2(CD14+CD282+) и TLR-6(CD14+CD286) на моноцитах проводили методом лазерной проточной цитофлюорометрии (Beckman Coulter, США). Полиморфизм аллельных вариантов генов TLR изучали методом ПЦР с последующим рестрикционным анализом тест-системами для молекулярно-генетического анализа, разработанными ГосНИИгенетика (Москва). Содержание цитокинов в сыворотке крови определялось методом ИФА согласно рекомендациям производителя: IFN- γ , IFN- α , IL-8 – с использованием тест-систем «Biosource» (США), MCP-1 (моноцитарный хемоаттрактантный протеин 1) – с применением тест-систем «Bender Medsystems» (Австрия).

При определении статистической обоснованности различия исследуемых групп применялся критерий Манна-Уитни для независимых групп и критерий Вилкоксона для

зависимых групп при максимально допустимом уровне ошибки первого рода $p=0,05$. Для анализа различия частот в двух независимых группах применялся двусторонний критерий Фишера-Ирвина с принятым уровнем ошибки первого рода $p=0,05$. Для оценки тесноты связи отдельных показателей использовался коэффициент корреляции по Спирмену.

Результаты и обсуждение

Анализ клинических данных позволил установить, что в раннем неонатальном периоде у детей I подгруппы (с полной клинической симптоматикой ЦМВИ) достоверно чаще встречались, чем у пациентов II подгруппы (с неполной клинической симптоматикой заболевания): гепатомегалия, гепатит, геморрагический синдром, тромбоцитопения, пневмония, постгипоксическая кардиопатия, судорожный синдром, синдром угнетения рефлексов, патологическая убыль в массе тела. Менингоэнцефалит, отечный синдром, миокардит имели место только у пациентов I подгруппы.

Развитие генерализованной ЦМВИ у наблюдаемых новорожденных детей сопровождалось значительными изменениями в иммунном статусе, особенно у детей с полной клинической симптоматикой. Так, в I подгруппе выявлено достоверное снижение экспрессии TLR-2 (CD14+CD282+) на моноцитах периферической крови по сравнению с контрольной группой ($45,4 \pm 8,9$ % и $76,2 \pm 5,6$ % соответственно, $p < 0,05$) и по сравнению со II подгруппой ($45,4 \pm 8,9$ % и $65,1 \pm 6,1$ % соответственно, $p < 0,05$). Установлена обратная корреляционная зависимость с уровнем вирусной нагрузки ($r=0,81$, $p < 0,05$). Аналогичные изменения были характерны и для TLR-6 (CD14+CD286+): достоверно более низкие значения экспрессии TLR-6 определялись в I подгруппе ($44,6 \pm 5,9$ %) относительно контроля ($61,1 \pm 1,4$ %, $p < 0,05$) и относительно II подгруппы ($57,8 \pm 2,2$ %, $p < 0,05$). Обнаруженное снижение экспрессии TLR-2 и TLR-6 объясняет высокую чувствительность к ЦМВИ и может обуславливать их участие в развитии клинической картины заболевания.

Проведенные исследования частоты полиморфизмов генов TLR-2 и TLR-6 у детей с генерализованной ЦМВИ в зависимости от выраженности клинических проявлений заболевания установили, что у новорожденных I подгруппы с полной клинической симптоматикой в сравнении со II подгруппой детей с неполной клинической симптоматикой, частота генотипа Ser/Pro была достоверно выше ($68,4$ % и $12,5$ % соответственно, $p < 0,05$), а генотипа Pro/Pro достоверно ниже ($26,3$ % и $81,3$ % соответственно, $p < 0,05$). Таким образом, аллельные варианты гена TLR-6 в точках полиморфизма Ser249Pro могут являться генетическими маркерами развития генерализованной ЦМВИ с полной клинической симптоматикой, а генотип Pro/Pro является протективным в отношении тяжести течения генерализованной ЦМВИ.

Результаты исследования содержания про- и противовоспалительных цитокинов и

хемокинов у новорожденных детей с генерализованной ЦМВИ с учетом клинических проявлений заболевания представлены в таблице 1.

Таблица 1

**Содержание про- и противовоспалительных цитокинов и хемокинов
у новорожденных с генерализованной ЦМВИ (пг/мл)**

Показатели	Дети с генерализованной ЦМВИ (основная группа, n=47)		Контрольная группа(n=26)
	I подгруппа (с полной клинической симптоматикой, n=29)	II подгруппа (с неполной клинической симптоматикой, n=18)	
IFN -α	8,3±0,9*	10,7±1,1*	15,9±2,1
IFN -γ	42,1±9,7*▲	86,5±21,9	100,8±27,4
MCP-1	1083,2±258,4*	783,5±223,1	600,5±53,9
IL -8	71,3±5,8*▲	40,7±11,3	26,3±7,7
IL -4	264,9±24,2*▲	138,9±41,1	74,1±24,8

* – достоверность различий по сравнению с контрольной группой (p<0,05);

▲ – достоверность различий между I и II подгруппами (p<0,05).

Установлено, что у всех наблюдаемых детей с генерализованной ЦМВИ (как в I, так и во II подгруппах) имело место достоверное снижение уровня интерферона -α (IFN – α) в сыворотке крови по сравнению с контрольной группой (p<0,05).

Известно, что интерферон -γ (IFN-γ) играет важную роль в развитии иммунного ответа Th1 типа. Анализ полученных данных показал, что в I подгруппе его содержание в сыворотке крови был в 2,4 раза ниже по сравнению с контрольной группой (p<0,05) и в 2,1 раза ниже, чем во II подгруппе. Во II подгруппе концентрация IFN-γ достоверно не отличалась от показателей контрольной группы.

Моноцитарный хемоаттрактантный протеин 1 (MCP-1) – представитель семейства СС-хемокинов выступает в роли мощного аттрактанта для моноцитов/макрофагов и активированных Т-лимфоцитов. В нашем исследовании только у детей I подгруппы (с полной клинической симптоматикой ЦМВИ) содержание MCP-1 достоверно превышало показатели контрольной группы (1083,2±258,4пг/мл и 600,5±53,9пг/мл соответственно, p<0,05). Полученные данные свидетельствуют о том, что цитомегаловирус может использовать хемокиновые рецепторы для контроля репликации вирусов [6] и приводить к сдвигу дифференцировки Т-хелперов в направлении Th2, не обеспечивающих формирование эффективного противовирусного иммунного ответа.

Уровень интерлейкина-8 (IL-8) – основного хемокина, участвующего в процессах миграции лейкоцитов, у детей I подгруппы был в 2,7 раз выше по сравнению с контрольной группой (p<0,05) и в 1,8 раз выше, чем во II подгруппе (p<0,05). Выявлена прямая

корреляционная зависимость содержания IL-8 и уровня вирусной нагрузки ($r=0,81$, $p<0,05$), что свидетельствует о влиянии IL-8 на репликацию цитомегаловируса.

Содержание интерлейкина – 4 (IL-4) – противовоспалительного цитокина, относящегося к субпопуляции Th-2, у детей I подгруппы было достоверно выше, как по сравнению с контрольной группой, так и II подгруппой ($p<0,05$), что отражает доминирование противовоспалительных цитокинов и ведет к снижению противовирусной иммунной защиты.

Проведенные исследования у детей с генерализованной ЦМВИ выявили нарушения взаимодействия врожденного и адаптивного иммунного ответа, зависящие от выраженности клинической симптоматики заболевания. Полученные данные являются обоснованием для дифференцированного подхода к оптимизации терапии генерализованной ЦМВИ у новорожденных детей.

Выводы

1. У детей при генерализованной ЦМВИ с полной клинической симптоматикой имеет место снижение экспрессии TLR-2 и TLR-6 на моноцитах, приводящее к редукции синтеза IFN- α и IFN- γ , выявлены: полиморфизм Ser249Pro гена TLR-6, повышение уровня MCP-1, IL-8 и IL-4. При ЦМВИ с неполной клинической симптоматикой отмечается только снижение концентрации IFN- α .
2. Дисбаланс факторов врожденного и адаптивного иммунного ответа приводит к изменению их взаимодействия, обуславливающего усиление вирусной репликации, сдвиг дифференцировки Т-хелперов в направлении Th2, не обеспечивающих формирование эффективного противовирусного иммунного ответа, что является одним из механизмов развития генерализованной ЦМВИ.

Список литературы

1. Бочарова И. И., Аксенов А. Н., Башакин Н. Ф. Итоги и перспективы научных исследований по проблеме внутриутробной инфекции новорожденных // Российский вестник акушера-гинеколога. – М., 2007. – Т. 7. – № 5. – С. 60–63.
2. Буданов П. В., Стрижаков А. Н. Этиология, патогенез, диагностика и лечение внутриутробной инфекции // Вопр. гинекологии, акушерства перинатологии. – 2010. – Т. 9. – № 3. – С. 61–69.
3. Ковальчук Л. В., Игнатьева Г. А., Ганковская Л. В. Иммунология. Методы. Учебное пособие для мед. вузов. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 245 с.

4. Козлов И. Г. Сигнальные рецепторы врожденного иммунитета: новая молекулярная мишень для диагностики и терапии воспалительных заболеваний // Вестник Российской Академии медицинских наук . – 2011. – № 1. – С. 42–50.
5. Кравченко Л. В., Афонин А. А. Особенности цитокинового статуса у детей первых месяцев жизни с генерализованной цитомегаловирусной инфекцией // Педиатрия. Журнал им. Г. Н. Сперанского. – 2011. – № 1. – С. 39–43.
6. Лутошкин И. С. Персистирующая герпесвирусная инфекция у детей с гломерулонефритом / И. С. Лутошкин // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2005. – № 4. – С. 32–37.
7. Ожегов А. М., Петрова И. Н., Тарасова Т. Ю. Новые возможности иммуотропной терапии врожденных инфекций у детей // Практическая медицина. – 2012. – № 5 (60). – С. 160–165.
8. Abdel-Latif Mel-A., Sugo E. N. Images in clinical medicine. Congenital cytomegalovirus infection // Engl. J. Med. – 2010. – Vol. 362. – № 9. – P. 833.
9. Gleason Ch. A. , Devaskar Sh. U. Avery's Diseases of the Newborn // Ninth Edition Chapter. – 2012. – № 36. – P. 445–467.

Рецензенты:

Попова Виктория Александровна, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник педиатрического отдела ФГБУ «РНИИАП» Министерства здравоохранения России, г. Ростов-на-Дону.

Лебеденко Александр Анатольевич, доктор медицинских наук, заведующий кафедрой детских болезней № 2 ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет», г. Ростов-на-Дону.