

УДК 616.831-02:616.9-074/076

ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ НЕЙРОНАЛЬНЫХ МАРКЕРОВ ПРИ НЕКОТОРЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

И.В. Дюйзен, В.А. Иванис, А.С. Михайлов, Е.С. Менчинская, И.В. Манжуло, О.С. Огурцова

Тихоокеанский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Ключевые слова: энцефалопатия, геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, хронический вирусный гепатит С.

THE NEURONAL MARKERS CONTENTS STUDY IN SOME INFECTIOUS DISEASES

I.V. Dyuzhen, V.A. Ivanis, A.S. Mihailov, E.S. Menchinskaya, I.V. Manzhulo, O.S. Ogurtsova
Pacific State Medical University (2 Ostryakova Ave. Vladivostok 690950 Russian Federation)**Background.** Serum levels of such proteins as the S100, glial fibrillary acidic protein (GFAP) and neuron-specific enolase (NSE) give an idea of the severity, depth and extent of the lesion of brain structures.**Methods.** In the serum of 20 patients with hemorrhagic fever with renal syndrome and chronic hepatitis C virus protein concentration was determined S100, GFAP and NSE.**Results.** The level of S100 in serum in hemorrhagic fever with renal syndrome has been raised 13 times; the concentration of GFAP did not differ from the control values, the content of NSE in 11 cases was increased by 5 times. S100 and GFAP levels in the serum of patients with chronic hepatitis C were close to normal values; the content of NSE in 11 patients was increased by 3 times.**Conclusions.** The presence of violations of the permeability of the blood-brain barrier, and neuropathology, possibly vascular and autoimmune origin that involves the cells of the neuroendocrine system in the pathogenesis of encephalopathy in hemorrhagic fever with renal syndrome and chronic hepatitis C virus.**Keywords:** encephalopathy, hemorrhagic fever with renal syndrome, chronic hepatitis C.

Pacific Medical Journal, 2015, No. 2, p. 27–30.

В последние годы исследованиям сывороточных и ликворных уровней нейрональных маркеров придают большое диагностическое значение при различных нейродегенеративных и нейрососудистых заболеваниях, эпилепсии, травмах, онкопатологии и метаболических повреждениях мозга, опухолях легких и кожи. Уровни таких белков как S100, глиальный фибриллярный кислый протеин (GFAP – glial fibrillary acidic protein), нейронспецифическая енолаза (NSE – neuron-specific enolase) дают представление о выраженности, глубине и распространенности поражения структур, объеме опухолей, прогнозе и исходе заболеваний мозга [1, 5, 9]. S100A1B – белок, принадлежащий к суперсемейству кальцийсвязывающих протеинов, присутствует в высоких концентрациях в астроглии, являясь информативным маркером любого повреждения мозга, включая травматическую и васкулярную патологию, обладает высокой чувствительностью и специфичностью при различных дисфункциях центральной нервной системы, в том числе нарушениях проницаемости гематоэнцефалического барьера и онкологических

заболеваниях [1, 9]. GFAP, экспрессирующийся в головном мозге астроцитами, характеризует проницаемость барьеров мозга (гемато- и ликворэнцефалического). Это высокоспецифичный маркер цитолиза, некроза и ускоренного апоптоза клеток мозговой ткани и сосудистого эндотелия мозга [9]. NSE – общий маркер дифференцированных нейронов, активно экспрессирующийся при их повреждениях, опухолевых процессах и нарушениях целостности гематоэнцефалического барьера. Уровень NSE при заболеваниях, сопряженных с непосредственным вовлечением нервной ткани в патологический процесс, дает представление и о степени выраженности патологии нейронов [5].

Поражение центральной нервной системы при генерализованных инфекциях считается закономерным типовым процессом. Частое развитие острых или хронических энцефалопатий выявляется при вирусных инфекциях в период виремии и беспрепятственного проникновения возбудителя через гематоэнцефалический барьер. Два инфекционных заболевания – геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) и хронический вирусный гепатит с (ХВГС) – совсем разных, на первый взгляд, объединяют, во-первых, особенности этиологических агентов – вирусов, содержащих РНК и неспособных к прямому цитопатогенному эффекту, а, во-вторых, развитие иммунного воспаления системного характера не только в клетках-мишенях, но и во всех органах и тканях [2, 3, 6, 7]. Морфологические изменения при этом касаются эндотелия капиллярной сети сосудов мозга, являющегося «шоковым» органом при развертывании инфекционного процесса.

Целью настоящей работы стало выяснение информативности изменений уровней трех нейрональных маркеров (S-100, NSE и GFAP) в механизмах энцефалопатии при этих вирусных инфекциях.

Материал и методы. Проведено клинико-лабораторное исследование 20 пациентов в острый период ГЛПС (среднетяжелое течение, возраст $23,1 \pm 1,5$ года) и 29 пациентов с ХВГС (умеренная степень активности, возраст $48,2 \pm 4,5$ года). Диагнозы были верифицированы иммунологически: непрямой метод флюоресцирующих антител при ГЛПС в титре 1:10–1:80, полимеразная цепная реакция при ХВГС с обнаружением РНК вируса в количестве от 10^4 до 10^6 МЕ/мл. Стандартные клинико-биохимические и инструментальные исследования проведены в инфекционных стационарах г. Владивостока. В сыворотке крови твердофазным

иммуноферментным методом с помощью тест-систем FUJIREBIO (Sweden), BioVendor (Czech Republic) и AnshLabs (USA) определяли уровни S100, GFAP и NSE. Контролем послужила сыворотка крови 30 здоровых доноров (Приморская краевая станция переливания крови) и ликвор 17 пациентов, взятый во время спинномозговой анестезии перед операцией по поводу варикозной болезни нижних конечностей (Приморская краевая клиническая больница № 1). По возрастнополовым характеристикам опытные и контрольная группы были вполне сопоставимы. Статистическую обработку полученных данных выполняли, используя методы описательной параметрической статистики с определением максимальных и минимальных значений признака, медианы (Me), средней арифметической (M) и ее средней ошибки (m), критериев Стьюдента и Манна-Уитни.

Результаты исследования. Клиническая картина острого периода ГЛПС была типичной: лихорадка, умеренный геморрагический синдром, тромбоцитопения и проявления острой почечной недостаточности. Признаки поражения центральной нервной системы зарегистрированы у всех больных и проявлялись общемозговой симптоматикой: головная боль, рвота на высоте головных болей, головокружение, астения, нарушение сна. У 4 пациентов отмечены оглушенность, галлюцинаторно-делириозный синдром, преходящая органическая симптоматика (анизорефлексия, горизонтальный нистагм), сухожильная гипорефлексия. У 2 пациентов с менингеальными знаками выполнена люмбальная пункция, но биохимическое исследование ликвора патологии не выявило.

Уровень S100 в сыворотке крови при ГЛПС был повышен в 13 раз, и тенденция к его возрастанию в ликворе отмечена у 2 больных. Концентрация GFAP в сыворотке и ликворе не отличалась от значений контроля. Содержание NSE в сыворотке у 11 из 20 пациентов с ГЛПС оказалось увеличенным в 5 раз, в ликворе в двух упомянутых случаях также отмечена тенденция к нарастанию концентрации этого маркера (табл.).

Среди больных ХВГС преобладали женщины (21 из 29 человек). Давность заболевания определялась условно, с момента его регистрации – от 5 до 14 лет. Преобладал 1-й генотип вируса (19 человек). Доминировали 1-я и 2-я степени фиброза печени (F1, F2 по шкале METAVIR при эластометрии печени) – 22 человека. 3-я степень фиброза (F3) диагностирована у 7 человек. Клиническая картина была типичной и соответствовала характеристике ХВГС как медленной пролонгированной инфекции со скудной симптоматикой без желтухи. Регистрировались слабость, быстрая утомляемость, сонливость, плохое настроение, снижение работоспособности, памяти и внимания. Эти проявления можно связать с постепенным прогрессированием энцефалопатии. По графическому тесту доминировала

Таблица

Активность нейрональных маркеров у больных ГЛПС и ХВГС

Маркер	Биосубстрат	Группа	n	M±m	min-max
S100, нг/л	Сыворотка крови	Контроль	29	63,5±3,8	26,7–202,2
		ГЛПС	14	822,4±35,9*	1,0–5100,2
		ХВГС	29	72,6±3,9	33,5–122,6
	Ликвор	Контроль	10	128,9±34,4	22,2–519,0
ГЛПС		2	244,1±12,6	138,1–350,0	
GFAP, мкг/л	Сыворотка крови	Контроль	20	0,037±0,005	0,009–0,100
		ГЛПС	14	0,040±0,004	0,001–0,070
		ХВГС	20	0,032±0,005	0,002–0,090
	Ликвор	Контроль	11	0,086±0,020	0,001–0,300
ГЛПС		2	0,060±0,010	0,014–0,060	
NSE, мкг/л	Сыворотка крови	Контроль	20	1,06±0,10	0,85–2,10
		ГЛПС	11	5,65±1,12*	2,10–10,80
		ХВГС	29	3,38±0,02*	2,20–4,50
	Ликвор	Контроль	17	0,95±0,08	0,07–1,50
ГЛПС		2	1,72±0,10	1,51–1,94	

* Разница с контролем статистически значима.

1-я степень печеночной энцефалопатии (24 человека), в остальных случаях диагностирована латентная стадия. Биохимические тесты отличались умеренной гипертрансаминаземией (2–3 нормы) у всех больных и тромбоцитопенией ($92-105 \times 10^9/\text{л}$) у 6 больных. Уровни S100 и GFAP в сыворотке крови были близки к показателям контрольной группы, содержание NSE в сыворотке у 11 пациентов оказалось увеличенным в 3 раза (табл.).

Обсуждение полученных данных. Известно, что ГЛПС – одна из клинических нозоформ хантавирусной инфекции человека, характеризующейся острым течением и мультиорганной патологией. Органами-мишенями хантавируса принято считать легкие и почки, хотя виремия, процессы диссеминации возбудителя и преимущественное значение иммунных реакций в патогенезе болезни делают закономерным вовлечение в инфекционный процесс всех органов, в том числе и центральной нервной системы [3, 12, 13]. Так, при тяжелых формах этой инфекции на материале аутопсий в головном мозге отмечены разнообразные поражения: от вазогенного и цитотоксического отека, очаговых гипоксических повреждений нейронов и глиоцитов до парциальных некрозов и массивных кровоизлияний, что является морфологической основой неврологических расстройств, коматозных состояний и может служить непосредственной причиной смерти [4, 7, 13]. Ряд исследователей допускает возможность прямого повреждения вирусом клеток мозга [4, 8]. Y. Lu et al. [11] при интраперитонеальном инфицировании хантавирусами новорожденных мышей выявили нуклеокапсидный протеин в нейронах головного мозга,

что позволило авторам считать это причиной быстрой гибели животных. Клинические проявления неврологических нарушений в ранние периоды заболевания обычно рассматриваются как острая энцефалопатия: головная боль, глубокая сомноленция и сопор, менингеальные знаки, галлюцинаторно-делириозный синдром, кратковременная потеря сознания, расстройства памяти. Выявленные на нашем материале преходящая органическая симптоматика, анизокория, горизонтальный нистагм и псевдобульбарные симптомы (поражения лицевого и подъязычного нервов), диффузная пирамидная недостаточность и вегетативные дисфункции описаны ранее [3, 8]. Причем при компьютерной томографии головного мозга у больных с подобной симптоматикой определялись отек, геморрагии, участки демиелинизации, гидроцефалия [8]. Исследования ликвора при наличии менингеальных знаков никогда не выявляли признаков воспалительной реакции, поэтому правильнее расценивать эти симптомы как «менингизм», но не менингоэнцефалит.

Таким образом, обнаружение увеличенных уровней нейромаркеров S100 и NSE при ГЛПС свидетельствует о нарушении барьерной функции мозга и развитии дисфункций нервной системы. Генез этих нарушений, вероятнее всего, связан с ведущими патогенетическими процессами – несостоятельностью функций эндотелиоцитов мозговых сосудов и тромбоцитов (клеток-мишеней, где реплицируется хантавирус), системными гемодинамическими и метаболическими нарушениями, а также иммунными дисфункциями.

Исследования поражения нервной системы при ХВГС выявляют смешанный генез хронической энцефалопатии: прямой цитопатогенный эффект вируса при виремии и вызванные им иммунопатологические реакции. Однако известно, что в патогенезе инфекции ключевую роль играет иммунный ответ макроорганизма в связи с низкой репликативной активностью вируса и, следовательно, низким уровнем виремии, свойственным хронической инфекции [6]. Четкая связь выраженности неврологических проявлений со степенью фиброза печени свидетельствует и о значении метаболических и токсических нарушений в механизме прогрессирующей печеночной энцефалопатии [2, 14].

К настоящему времени доказана репликация вируса гепатита с и связанные с этим внепеченочные изменения, в том числе в тканях паренхиматозных органов, костном мозге, сосудистом эндотелии, клетках иммунной системы [6, 14]. О поражении центральной нервной системы у больных ХВГС, клинически проявляющееся немотивированной усталостью, астенией, нарушением когнитивных способностей, снижением концентрации внимания и памяти, свидетельствуют ведущие гепатологи [2, 6]. Патогенетическая роль вируса в повреждении периферических нервов подтверждается обнаружением его РНК в биоптатах пораженных

нервов и в эпинеуральных клетках [10]. Некоторыми исследователями головной мозг рассматривается даже в качестве своеобразного резервуара вируса гепатита С, обуславливающего резистентность к противовирусной терапии [15].

Результаты исследования нейромаркеров у больных ХВГС с клиникой умеренно выраженной энцефалопатии подтверждают нарушения барьерной функции гематоэнцефалического барьера. Кроме того, увеличение уровней NSE можно объяснить и частым вовлечением в инфекционный процесс клеток нейроэндокринной системы (надпочечников, щитовидной железы), а также аутоиммунными процессами, закономерными для ХВГС. Как и при других хронических вирусных инфекциях с полиорганной недостаточностью, здесь большое значение имеет дисбаланс, обусловленный нарушением взаимосвязей в системах регуляторной интеграции: иммунной, нервной, эндокринной. Этот дисбаланс лежит в основе таких клинических проявлений ХВГС как астения, вегетоэндокринопатии, синдром хронической усталости. Безусловно, ведущей патогенетической основой энцефалопатии при углублении фибротических процессов в печени совместно с эндотоксикозом считаются иммунные нарушения.

Таким образом, уровни белков S100 и NSE в сыворотке крови служат информативными маркерами энцефалопатии у пациентов с ГЛПС и ХВГС. Патогенетической основой неврологических нарушений при генерализованных инфекциях с полиорганной недостаточностью является не прямое действие вируса, а типичные иммунопатологические реакции в тканевых структурах центральной нервной и вегетативной систем, а также в сосудистом эндотелии.

References

1. Busygin S.N., Klink Yu.P., Bubnova I.D. The relation between serum S100 protein level and severity of encephalopathy in sepsis // *Ural Medical Journal*. 2012. No. 12. P. 126–129.
2. *Viral hepatitis: clinical features, diagnosis, treatment* / Yuschuk N.D., Klimova E.A., Znoyko O.O. [et al.] M.: GEOTAR-Media, 2012. 155p.
3. Hemorrhagic fever with renal syndrome: modern aspects of ecology, etiology, epidemiology, immunopathogenesis, diagnosis, and treatment clinics // Slonova R.A., Tkachenko E.A., Ivanis V.A. [et al.] Vladivostok: Primpolygrafkombinat, 2006, P. 96–196.
4. Evseev A.N. Hemorrhagic fever with renal syndrome: patho- and morphogenesis, macro- and microscopic examination. Khabarovsk: Omega-Press, 2010. 296 p.
5. Zhukova I.A., Aliferova V.M. Neuron specific enolase as a nonspecific marker of neurodegenerative process // *Bulletin of Siberian Medicine*. 2011. No. 2. P. 15–21.
6. Ignatova T.M., Aprosina Z.G., Serov V.V. [et al.] Extrahepatic manifestations of chronic HCV-infection // *Russian Medical Journal*. 2001. No. 2. P. 13–18.
7. Kaminskiy Yu.V. Clinical morphology of infectious diseases in Primorsky territory. Vladivostok: Medicine FE, 2011. 216 p.
8. Novikova L.B. Brain damage in hemorrhagic fever with renal syndrome in Bashkortostan: thesis abstract, MD. Perm, 2000. 41 p.
9. Shaytanova T.Yu., Saskin V.A., Nedashkovskiy E.V. Practical use of S100B protein in acute cerebral pathology // *Bulletin of anesthesiology and resuscitation*. 2014. No. 2. P. 63–71.

10. Bonetti B., Scardoni M., Monaco S. [et. al.] Hepatitis C virus infection of peripheral nerves in type II cryoglobulinaemia // *Virchows Arch.* 1999. Vol. 434. P. 533–535.
11. Lu Yu, J. Hong Cui, Yu Jing Sun [et al.] Hantavirus infection of neurons in newborn mice and primary cultures induces delayed HSP70 response and results in cell death // *Abstracts of VIII international conference of HFRS, HPS and hantaviruses.* Athens, Greece, 2010. P. 191.
12. Marcotic A. Clinic and laboratory findings of HFRS patients in South-East Europe // *Abstracts of IX international conference of HFRS, HPS and hantaviruses.* Beijing, China, 2013. P. 13.
13. Manigold T., Vial P. Human hantavirus infections: epidemiology, clinical features, pathogenesis and immunology // *Swiss Med. Wkly.* 2014. Vol. 144, No. 13937. P. 1–10.
14. Origgi L., Vanoli M., Carbone A. [et. al.] Central nervous system involvement in patients with HCV-related cryoglobulinemia // *Am. J. Med. Sci.* 1998. Vol. 315. P. 208–210.
15. Thomas H.C., Torok M.E., Forton D.M. [et. al.] Possible mechanisms of action and reasons for failure of antiviral therapy in chronic hepatitis C // *Journal of Hepatology.* 1999. Vol. 31, No. 1. P. 152–159.

Поступила в редакцию 24.11.2014.

Исследование содержания нейрональных маркеров при некоторых инфекционных заболеваниях

И.В. Дюйзен, В.А. Иванис, А.С. Михайлов, Е.С. Менчинская, И.В. Манжуло, О.С. Огурцова

Тихоокеанский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Резюме. Изучены сывороточные уровни трех нейрональных маркеров: белка S100, фибриллярного кислого гликопротеина и нейронспецифической энолазы у 20 пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом и 29 пациентов с хроническим вирусным гепатитом С. Показано наличие нарушений проницаемости гематоэнцефалического барьера, а также нейропатологии, возможно васкулярного и аутоиммунного генеза, что предполагает участие клеток нейроэндокринной системы в патогенезе энцефалопатий при этих заболеваниях.

Ключевые слова: энцефалопатия, геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, хронический вирусный гепатит С.

УДК 612.112.94.017.4-097.3

АНАЛИЗ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ CD56 И CD57 ЦИТОТОКСИЧЕСКИМИ Т-ЛИМФОЦИТАМИ РАЗЛИЧНОГО УРОВНЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

И.В. Кудрявцев^{1,2}, А.Г. Борисов³, А.Е. Волков¹, А.А. Савченко³, М.К. Серебрякова², А.В. Полевщиков^{1,2}

¹ Школа биомедицины Дальневосточного федерального университета (690950, г. Владивосток, ул. Суханова, 8),

² Институт экспериментальной медицины (197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12),

³ НИИ медицинских проблем Севера (660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3г)

Ключевые слова: кластеры дифференцировки, проточная цитометрия, популяции лимфоцитов, эффекторные клетки.

CD56 AND CD57 EXPRESSION BY DISTINCT POPULATIONS OF HUMAN CYTOTOXIC T LYMPHOCYTES

I.V. Kudryavtsev^{1,2}, A.G. Borisov³, A.E. Volkov¹, A.A. Savchenko³, M.K. Serebryakova², A.V. Polevshchikov^{1,2}

¹ School of Biomedicine of Far Eastern Federal University (8 Sukhanova St. Vladivostok 690950 Russian Federation), ² Institute of Experimental Medicine (12 Acad. Pavlov St. St. Petersburg 197376 Russian Federation), ³ Scientific Research Institute of Medical Problems of the North (3 Partizana Djelezniaka St. Krasnoyarsk 660022 Russian Federation).

Background. Cytotoxic T cell subsets with distinct homing potentials, phenotype and effector functions play an important part in many chronic viral infections and autoimmune diseases.

Methods. Using 10-color flow cytometry we characterized cytotoxic T cell subsets based on expression of CD45RA, CD62L, CD27, and CD28 and compared the expression of CD56 and CD57 between these subsets.

Results. It was shown that CD56 positive cells were predominantly immature T-cells, expressing CD27 and/or CD28. CD57 was found mainly on the cell membrane of most mature populations, lacking CD27 or both co-stimulation molecules. Co-expression of both antigens was determined exclusively on the most mature populations of T cells, which belonged to effector memory (CD45RA⁺CD62L⁻) and terminally differentiated effectors (CD45RA⁺CD62L⁺) CD3⁺CD8⁺ lymphocytes.

Conclusions. According to our data in peripheral blood we can identify several populations of cytotoxic T cell with similar proper-

ties and phenotype, that due to imperfection of contemporary classifications belong to perfectly different populations.

Keywords: cluster of differentiation, flow cytometry, lymphocyte populations, effector cells.

Pacific Medical Journal, 2015, No. 2. p. 30–35.

В последние годы число работ, посвященных оценке уровня дифференцировки Т-лимфоцитов в периферической крови при различных патологических состояниях, неуклонно растет. Для выявления основных стадий созревания Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток обычно используются антитела против кластеров дифференцировки (Cluster of Differentiation – CD) 45RA или 45RO, а также против молекул, определяющих миграционную способность клеток, – CD62L или CD197 (CCR7) [14]. Такая комбинация антител позволяет выделить четыре популяции Т-лимфоцитов: «наивные» (N), экспрессирующие оба антигена, клетки центральной (CM) и эффекторной (EM) памяти с фенотипами CD45RA⁺CD62L⁺ и CD45RA⁺CD62L⁻, соответственно, и «терминально-дифференцированные CD45RA⁺-клетки эффекторной памяти (TEMRA), позитивные по экспрессии CD45RA и негативные по экспрессии CD62L. Для более детального анализа указанных выше популяций используют дополнительные маркеры, в качестве которых выступают антитела