

© Коллектив авторов, 2014

А.А. Сависько¹, М.П. Костинов², Г.Г. Харсеева¹, Н.Е. Ястребова², А.Д. Шмитько²,
Е.П. Евдокимова¹, И.А. Иванова³, А.Л. Трухачев³, А.В. Лабушкина¹,
А.П. Черганцев⁴, И.В. Подгорный¹

СОСТОЯНИЕ ИММУНИТЕТА К *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* У ЗДОРОВЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ

¹ГБОУ ВПО Ростовский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Ростов-на-Дону;

²Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток РАМН им. И.И. Мечникова, Москва;

³ФГУЗ Ростовский научно-исследовательский противочумный институт (Рост НИПЧИ) Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону; ⁴ГБОУ ВПО Ульяновский государственный университет МЗ РФ, г. Ульяновск, РФ

Изучена роль факторов естественного и адаптивного иммунитета у 180 новорожденных в зависимости от отягощенности инфекционного анамнеза. Установлено достоверное увеличение синтеза ИЛ1 и ИЛ6 в супернатантах культур клеток пуповинной крови при воздействии вакциной Пневмо 23 при низких значениях антител IgG к *S. pneumoniae* в группе новорожденных с отягощенным инфекционным анамнезом по сравнению с детьми с благоприятным анамнезом. Выводы: низкий уровень антител при высокой активности провоспалительных цитокинов имеет важное диагностическое и прогностическое значение и может рассматриваться как фактор, предрасполагающий к развитию заболеваний, вызванных *S. pneumoniae* у детей.

Ключевые слова: новорожденные, пневмококковая инфекция, естественный, адаптивный иммунитет, цитокины, Toll-подобные рецепторы.

The role of natural factors and adaptive immunity was studied in 180 newborns depending on burdeness of infectious anamnesis. The significant increase in the synthesis of IL1 and IL6 in the culture supernatants of cord blood cells when exposed to the vaccine Pneumo 23 at low values of IgG antibodies to *S. pneumoniae* was proved for newborns with burdened infection anamnesis in comparison to children with a favorable anamnesis. Conclusions: The low levels of antibodies with high activity of proinflammatory cytokines have important diagnostic and prognostic value and may be considered as predisposing factor to the development of diseases caused by *S. pneumoniae* in children.

Key words: newborns, pneumococcal infection, natural, adaptive immunity, cytokines, Toll-like receptors.

Пневмококковая инфекция продолжает оставаться одной из центральных проблем современной педиатрии [1]. Это связано с увеличением этиологической значимости пневмококка в структуре заболеваний органов дыхания [2], летальность от которых продолжает занимать лидирующее место в структуре смертности среди детей в возрасте до 5 лет [3]. Риск инфицирования выше у детей, рожденных от матерей с отягощенным анамнезом, в т.ч. инфекционным: с хроническими очагами инфекции или перенесших острые респираторные заболевания и другие инфекционно-воспалительные процессы во время беременности [4–6]. Тяжесть

течения заболевания у новорожденных и грудных детей обусловлена не только их анатомо-физиологическими особенностями, но и состоянием иммунологической защиты. Слабый антигеновый ответ новорожденных связан с их способностью продуцировать лишь IgM и субклассы IgG₁ и IgG₃, но не IgG₂ и не IgG₄, к которым принадлежат антитела к капсулярному полисахариду бактерий, что обуславливает их предрасположенность к развитию бактериальных инфекций. Поэтому защита ребенка в периоде неонатальной адаптации и в первые месяцы жизни поддерживается во многом за счет полученного от матери набора антител в основном класса G, которые

Контактная информация:

Сависько Анна Алексеевна – к.м.н., доц. каф. пропедевтики детских болезней с курсом здорового ребенка РостГМУ

Адрес: Россия, 344022 г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29

Тел.: (928) 226-61-48, E-mail: Annsav@mail.ru

Статья поступила 27.02.14, принята к печати 24.09.14.

проникают к плоду через плаценту. К возрасту 6 месяцев ребенок теряет материнские антитела, а способность к выработке собственных антител к полисахаридам стрептококка формируется у детей в процессе функционального становления иммунной системы к 5-летнему возрасту. Поэтому наиболее высокие показатели заболеваемости регистрируются среди детей младшего возраста, которые являются основной целевой группой для проведения вакцинации [7].

До настоящего времени не до конца изучены патогенетически значимые механизмы развития пневмотропных заболеваний, продолжается поиск ранних прогностических критериев, позволяющих формировать группы риска развития и хронизации бактериальной инфекции, вызванной условно-патогенными микроорганизмами у новорожденных детей [8].

Одним из перспективных направлений является изучение системы врожденного иммунитета и, в частности, группы Toll-подобных рецепторов (TLR) [9, 10], которые осуществляют распознавание молекулярных паттернов, ассоциированных с различными микроорганизмами, запуская эффекторные механизмы врожденного иммунитета [11–13]. Активация TLR приводит к индукции широкого спектра биологических реакций, в т.ч. синтеза провоспалительных цитокинов и Т-клеточной активации, определяющей развитие адаптивного иммунного ответа [14, 15].

Цель исследования – оценить роль факторов естественного (уровень экспрессии TLR и провоспалительных цитокинов под влиянием вакцинного препарата Пневмо 23) и адаптивного иммунитета (содержание IgG-антител к *S. pneumoniae*) у новорожденных детей.

Материалы и методы исследования

Проведено обследование 180 новорожденных, родившихся от женщин активного репродуктивного периода в возрасте от 18 до 44 лет в МБУЗ «Родильный дом № 2» г. Ростова-на-Дону.

На основании инфекционного анамнеза были выделены две клинические группы новорожденных. В состав 1-й клинической группы вошли новорожденные (140 чел.), у матерей которых были верифицированы различные инфекционно-воспалительные заболевания во время беременности. Так, у 30 женщин (16,7%) отмечались один или несколько эпизодов ОРЗ с развитием острых или обострения хронических очагов инфекции со стороны ЛОР-органов, у 75 (41,7%) – наличие острых или обострения хронических инфекционно-воспалительных заболеваний со стороны мочевой системы и урогенитального тракта, у 35 (19,4%) – одновременно были зарегистрированы патологические изменения со стороны органов дыхательной системы, а также мочевого и урогенитального тракта. Во 2-ю клиническую группу были выделены 40 новорож-

денных с благоприятным инфекционным анамнезом, у матерей которых во время беременности не было каких-либо инфекционно-воспалительных заболеваний.

Обследование проводили с информированного согласия родителей. Материалом для исследования явилась пуповинная кровь.

При исследовании факторов естественного иммунитета у новорожденных 1-й (23 чел.) и 2-й (14 чел.) групп определяли экспрессию TLR на моноцитах периферической крови (МНК), а также спонтанную и индуцированную продукцию провоспалительных цитокинов в супернатантах культур клеток под влиянием 23-валентной полисахаридной пневмококковой вакцины (ППВ23) «Пневмо 23». Определяли уровень экспрессии TLR2, TLR4 и продукции цитокинов (ИЛ1 β , ИЛ6 и ФНО α) в пуповинной крови новорожденных при воздействии оптимальной дозы вакцины, которая была выбрана на основании результатов предварительного исследования. Анализ экспрессии TLR2 и TLR4 проводили на многофункциональном ридере «Synergy TM2». Оценивали среднюю интенсивность флуоресценции, величину выражали в условных единицах флуоресценции (у.е.).

Спонтанную выработку цитокинов (ИЛ1 β , ИЛ6, ФНО α) определяли, культивируя МНК в полной культуральной среде RPMI 1640 без добавления стимуляторов.

Индукционную продукцию цитокинов (ИЛ1 β , ИЛ6, ФНО α) определяли в супернатантах культур клеток методом ИФА (иммуноферментные тест-системы фирмы «Вектор-Бест», г. Новосибирск).

Исследование факторов адаптивного иммунитета проводили у новорожденных 1-й (140 чел.) и 2-й (40 чел.) клинических групп. В сыворотке пуповинной крови при помощи иммуноферментного анализа (ИФА) определяли содержание IgG к *S. pneumoniae*. Для проведения ИФА использовали иммуноферментную систему производства НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН [16], результаты указывали в условных единицах (у.е.).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием статистических пакетов «Microsoft Excel 2000» и «Statistica» для Windows XP с использованием параметрических и непараметрических методов статистики. При анализе полученных результатов определяли средние величины и стандартную ошибку ($M \pm m$). Достоверность полученных данных оценивали при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

В результате исследования установлено, что при стимуляции клеточной культуры МНК ППВ23 «Пневмо 23» через 24 ч антигенного воздействия наблюдали увеличение уровня экспрессии TLR2 и TLR4 в обеих клинических группах.

При проведении дальнейшего анализа влияния вакцины на уровень экспрессии TLR2, TLR4 и продукции цитокинов (ФНО α , ИЛ1 β , ИЛ6) рассчитывали коэффициенты стимуляции (КС). За единицу принимали уровень спонтанной экспрессии TLR и продукции цитокинов. КС рас-

считывали как отношение показателей стимулированной экспрессии TLR2, TLR4 и индуцированной продукции цитокинов в супернатантах МНК к спонтанной, что позволило определить их прирост и повысить стандартизацию метода.

При определении средних значений КС было установлено, что исследуемая вакцина оказывала незначительный стимулирующий эффект на уровень экспрессии TLR в двух исследуемых группах (рис. 1). Необходимо отметить, что не было выявлено различий между значениями КС у детей 1-й (КС TLR2 $1,21 \pm 0,1$; TLR4 $1,22 \pm 0,1$) и 2-й клинических групп (КС TLR2 $1,17 \pm 0,05$; TLR4 $1,22 \pm 0,1$). Кроме того, не было установлено различий при рассмотрении КС между TLR2 и TLR4.

Определение функциональной активности TLR по величине КС продукции цитокинов в стимулированной культуре МНК оказалось более информативным.

Так, при использовании вакцины Пневмо 23 показатели КС продукции ИЛ1 β были выше ($p < 0,05$) в 1-й группе детей с неблагоприятным преморбидным фоном ($1,8 \pm 0,5$) по сравнению со 2-й группой детей ($0,57 \pm 0,1$). Аналогичные изменения были установлены и в отношении ИЛ6: КС у новорожденных 1-й группы составил $8,12 \pm 3,6$ и был выше, чем у детей 2-й группы ($2,5 \pm 1,5$) ($p < 0,05$). Достоверных различий в синтезе ФНО α , индуцированном вакцинным препаратом, получено не было (рис. 1).

При оценке факторов адаптивного иммунитета по уровню антител у новорожденных указанных клинических групп были получены следующие результаты (рис. 2). Исследование содержания антител IgG к *S. pneumoniae* показало, что их уровень у детей 1-й группы с отягощенным инфекционным анамнезом ($47,8 \pm 2,1$ у.е.) был ниже ($p < 0,05$), чем у детей 2-й группы с благоприятным преморбидным фоном ($55,3 \pm 1,6$ у.е.).

Обсуждение

Полученные данные позволили установить, что стимуляция ППВ23 МНК детей обеих клинических групп оказывала незначительный стимулирующий эффект на уровень экспрессии TLR2 и TLR4 вне зависимости от инфекционного анамнеза. При этом их функциональная активность, оцениваемая по уровню синтеза цитокинов ИЛ1 β и ИЛ6, была выше у детей, рожденных от матерей, перенесших инфекционно-воспалительные заболевания во время беременности. Это согласуется с данными Ю.Н. Александрова, свидетельствующими об увеличении уровня провоспалительных цитокинов (ИЛ1А, ИЛ2, ИЛ6) у новорожденных с отягощенным инфекционным анамнезом. Увеличение циркулирующих пулов данных цитокинов, возможно, связано с развитием системной воспалительной реакции в ответ на микробную инва-

зию [17], что подтверждает их роль в запуске адаптивного иммунного ответа, а также регуляции количества и функциональной активности клеток-эффекторов (нейтрофилов, макрофагов, лимфоцитов). Увеличение концентрации ФНО α в пуповинной крови может служить ранним диагностическим признаком гипоксических изменений в организме новорожденного ребенка, что свидетельствует о его участии в патогенезе транзиторных нарушений в раннем периоде адаптации [17]. Выявленный в нашем исследовании дисбаланс в системе цитокинов, вероятно, имеет важное патогенетическое и диагностическое значение при развитии различных инфекционных заболеваний у новорожденных и детей грудного возраста.

Изменения в гуморальном звене характеризовались более низким уровнем антител IgG к *S. pneumoniae* у детей с неблагоприятным преморбидным фоном по сравнению с детьми, рожденными с благоприятным анамнезом.

По-видимому, высокие значения провоспалительных цитокинов при низком содержании противопневмококковых антител позволяют предположить готовность детского организма к развитию воспалительных реакций при воздействии антигенного фактора. Данный признак может рассматриваться как маркер риска развития пневмококковой инфекции, что еще раз подтверждает необходимость проведения ранней вакцинации детей с учетом инфекционного анамнеза их матерей.

Таким образом, полученные данные подтверждают целесообразность проведения ком-

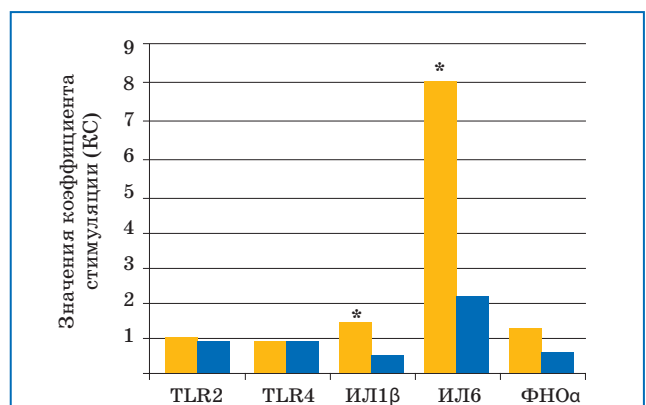


Рис. 1. Показатели естественного иммунитета при использовании вакцины Пневмо 23.

Здесь и на рис. 2: 1-й столбик – 1-я группа, 2-й столбик – 2-я группа; * $p < 0,05$ при сравнении показателей детей 1-й и 2-й групп.

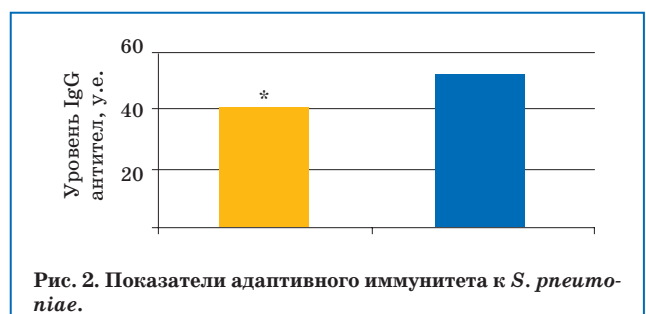


Рис. 2. Показатели адаптивного иммунитета к *S. pneumoniae*.

плексного обследования женщин на этапах планирования и ведения беременности с включением их бактериологического и серологического исследования для выявления причинно-значимых микроорганизмов в развитии микробно-воспалительных заболеваний, связанных с изменениями симбионтной микрофлоры, и их лечения.

Выводы

1. При характеристике естественного иммунитета установлено достоверное увеличение синтета ИЛ1 и ИЛ6 в супернатантах культур клеток пуповинной крови при воздействии ППВ23 в группе новорожденных с отягощенным инфекционным анамнезом по сравнению с детьми с благоприятным анамнезом.

2. При оценке адаптивного иммунитета выявлены достоверно низкие значения антител IgG к *S. pneumoniae* в группе детей с отягощенным инфекционным анамнезом по сравнению с детьми, рожденными от матерей, не имевших инфекционно-воспалительных заболеваний во время беременности.

3. Низкий уровень противопневмококковых антител в сочетании с высокой активностью провоспалительных цитокинов могут иметь важное диагностическое и прогностическое значение и рассматриваться как фактор потенциальной угрозы, предрасполагающий к развитию инфекционно-воспалительных заболеваний у новорожденных и детей грудного возраста, вызванных *S. pneumoniae*.

Литература

1. Moberley S, Holden J, Tatham DP, Andrews RM. Cochrane Database Syst. Rev. 2013; 1: CD000422 Vaccines for preventing pneumococcal infection in adults. <https://www.clinicalkey.com/#!/ContentPlayerCtrl/doPlayContent/2-s2.0-23440780/>
2. Croucher NJ, Finkelstein JA, Pelton SI, et al. Population genomics of post-vaccine changes in pneumococcal epidemiology. Nat. Genet. 2013; 45 (6): 656–663. <https://www.clinicalkey.com/#!/ContentPlayerCtrl/doPlayContent/3-s2.0-B9781437716047002979/>
3. World Health Organization. Pneumococcal conjugated vaccine for childhood immunization – WHO position paper. Weekly Epidemiol. Rec. 2007; 7: 93–104.
4. Костинов М.П., Лавров В.Ф. Вакцины нового поколения в профилактике инфекционных заболеваний. 2-е изд. М.: МВД, 2010: 192 с.
5. Костинов М.П., Мещерякова А.К., Фошина Е.П. и др. Клиническое течение острой респираторной инфекции и состояние микробиоценоза верхних дыхательных путей у беременных. Журнал микробиология. 2012; 5: 12–16.
6. Колесаева Ж.Ю. Микробиоценоз влагалища у рожениц после естественных родов и операции кесарева сечения: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. СПб., 2012.
7. Катрецакая Г.Г. Факторы патогенности условно патогенной микрофлоры нижних дыхательных путей при внебольничных пневмониях: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Пермь, 2012.
8. Анганова Е.В. Условно-патогенные энтеробактерии: доминирующие популяции, биологические свойства, медико-экологическая значимость: Автореф. дисс. ... докт. биол. наук. Иркутск, 2012.
9. Байраков А.Л., Воронаева Е.А., Афанасьев С.С. и др. Роль и биологическое значение Толл-подобных рецепторов в антиинфекционной резистентности организма. Вестник Российской АМН. 2008; 1: 45–54.
10. Ковальчук Л.В. Исследование экспрессии генов цитокинов в процессе культивирования лейкоцитов здоровых доноров. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2012; 2: 60–63.
11. Awomoyi AA, Rallabhandi P, Pollin TI, et al. Association of TLR4 polymorphisms with symptomatic respiratory syncytial virus infection in high-risk infants and young children. J. Immunol. 2007; 179 (5): 3171–3177.
12. Blasius AL, Beutler B. Intracellular toll-like receptors. Immunity. 2010; 32 (3): 305.
13. Ганковская О.А. Молекулярно-генетические механизмы врожденного иммунитета на уровне слизистых оболочек при патологии инфекционного генеза: Автореф. дисс. ... докт. мед. наук. М., 2010.
14. Гришук А.Ю. Комплексная оценка цитокинов и функциональной активности фагоцитов у беременных с вирусной инфекцией: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. М., 2007: 35 с.
15. Греченко В.В. Анализ баланса оппозитных цитокинов, ассоциированных с рецепторами врожденного иммунитета, у больных с острыми патологическими состояниями: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. М., 2011.
16. Ястребова Н.Е. Система для мониторинга антител к условно патогенным бактериям и аутоантител. Опыт ее применения: Автореф. дисс. ... докт. биол. наук. М., 2007.
17. Александрова Ю.Н. Цитокины, IL1A, IL2, IL6, ФНОα у новорожденных детей различного гестационного возраста с гипоксическим поражением ЦНС и менингитом: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. М., 2011.