



Ан.А. Сависько¹, М.П. Костинов², Г.Г. Харсеева¹, Н.Е. Ястребова²,
А.Д. Шмитко², И.А. Иванова³, А.В. Лабушкина¹, И.В. Подгорный¹

АКТИВАЦИЯ TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ И СИНТЕЗА ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ, ВЫЗВАННАЯ ВАКЦИНОЙ ПРОТИВ ГЕМОФИЛЬНОЙ ТИПА В ИНФЕКЦИИ В ПУПОВИННОЙ КРОВИ НОВОРОЖДЕННЫХ)

¹Ростовский государственный медицинский университет,
Кафедра пропедевтики детских болезней, кафедра микробиологии и вирусологии №2.
Россия, 344022, г. Ростов-на-Дону, пер Нахичеванский, 29. E-mail: Annsav@mail.ru

²Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова,
Лаборатория вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний.
Россия, 105064, г. Москва, Малый Казенный переулок, д. 5а.

³Ростовский научно-исследовательский противочумный институт,
Лаборатория иммунологии особо опасных инфекций.
Россия, 344002, г. Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40.

Цель: оценить показатели естественного и адаптивного иммунитета к H.influenzae типа b в пуповинной крови новорожденных детей.

Материалы и методы: обследовано 140 новорожденных от женщин с отягощенным инфекционным анамнезом во время беременности (Iгр) и 40 детей – с благоприятным анамнезом (II гр). На моноцитах (МНК) пуповинной крови определяли уровень экспрессии TLR2, TLR4 и продукции цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО α) под воздействием вакцины Акт-Хиб. В сыворотке пуповинной крови путем ИФА определяли содержание IgG-антител к H. influenzae типа b.

Результаты: под воздействием вакцины различий по уровню экспрессии TLR2 и TLR4 выявлено не было. Уровень синтеза цитокинов ИЛ-1 и ИЛ-6 был выше у детей Iгр. при более низком ($p<0,05$) содержании IgG-антител к H.influenzae типа b по сравнению с детьми II группы.

Заключение: низкий уровень противогемофильных антител при повышенной активности провоспалительных цитокинов может иметь важное прогностическое значение и рассматриваться как фактор риска развития Hib-инфекций у детей с неблагоприятным инфекционным анамнезом.

Ключевые слова: новорожденные, гемофильная инфекция, иммунитет, цитокины, TLR.

A.A. Savisko¹, M.P. Kostinov², G.G. Harseeva¹, N.E. Yastrebova², A.D. Shmitko²,
I.A. Ivanova³, A.V. Labushkina¹, I.V. Podgorniy¹

ACTIVATION OF TOLL-LIKE RECEPTORS AND SYNTHESIS OF PROINFLAMMATORY CYTOKINES, CAUSED BY THE VACCINE AGAINST HAEMOPHILUS TYPE B INFECTIONS IN UMBILICAL CORD BLOOD OF NEWBORNS

¹Rostov State Medical University,
Department propaedeutics childhood diseases, Department of Microbiology and Virology.
29 Nahichevansky st., Rostov-on-Don, Russia, 344022. E-mail: Annsav@mail.ru

2I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Serums,
Laboratory vaccinal and immunotherapy of allergic diseases.
5a Maliy Kazenny st., Moscow, Russia, 105064.



³Rostov Institute for Plague Control of the Federal Agency on Consumer Rights Protection and Human Welfare superviso,
Laboratory of Immunology of especially dangerous infections.
117/40 M. Gorkogo st., Rostov-on-Don, Russia, 344002.

Purpose: to assess the parameters of natural and adaptive immunity to H.influenzae type b in infants to predict the risk of Hib-infection.

Materials and methods: examined two groups of infants: I group- born to women with infections during pregnancy (140 pers.), II group- born to mothers without infections during pregnancy (40 pers.). On monocytes (MNCs) cord blood to determine the level of expression of TLR2, TLR4 and cytokine production (IL-1 β , IL-6, TNF) under the influence of polysaccharide conjugate vaccine to prevent infection by H.influenzae type b («Act-HIB»). In umbilical blood serum were determined with ELISA of IgG to H. influenzae type b.

Results: under the impact of the vaccine on cord blood MNCs differences in the level of expression of TLR2 and TLR4 have been identified. Functional activity of MNCs, estimated by the synthesis of IL-1 and IL-6 in the supernatants of cell cultures was higher in I group of children. It was established that the level of IgG antibodies to H.influenzae type b in children I group was lower ($p < 0.05$) than children of II group.

Summary: the low level of antiHaemophilus antisubstance in combination with high activity of proinflammatory cytokines may have important diagnostic and prognostic value and may be considered as a factor predisposing to the development of diseases in neonates and infants caused by H.influenzae.

Keywords: newborn, haemophilus infection, immunity, cytokines, Toll-like receptors.

Введение

Актуальность проблемы

Одной из наиболее частых причин заболеваемости среди детей первых лет жизни являются инфекции, вызванные H. Influenzae типа b (Hib-инфекции), носителями которой являются около 40% детей до 5-летнего возраста [16, 12]. Клинические проявления Hib-инфекции разнообразны. Установлена роль H. Influenzae типа b в этиологии гнойного менингита, эпиглоттита, сепсиса, хронического бронхита, пневмонии, среднего отита, синусита, конъюнктивита, остеомиелита и других клинических форм, которых насчитывается более 20 [5]. В настоящее время во всем мире регистрируется рост заболеваемости гемофильной инфекцией, особенно ее системными формами, среди которых около 50% составляет бактериальный менингит [11]. Гемофильная инфекция широко распространена на территории Российской Федерации и является актуальной проблемой отечественного здравоохранения [11]. Риск инфицирования выше у детей с неблагоприятным преморбидным фоном, в том числе, рожденных от матерей с отягощенным инфекционным анамнезом: с хроническими очагами инфекции и/или перенесших острые респираторные заболевания во время беременности [2,3,9]. Наиболее высокие показатели заболеваемости регистрируются среди детей младшего возраста (6-18 месяцев), которые и являются основной целевой группой для проведения вакцинации - единственного эффективного средства специфической профилактики Hib-инфекции [8].

Однако до настоящего времени не до конца изучены патогенетически значимые механизмы развития данных заболеваний, продолжается поиск ранних прогностических критериев, позволяющих формировать группы риска развития и хронизации бактериальной инфекции, вызванной H.influenzae у новорожденных, грудных детей и детей раннего возраста [10].

Одним из наиболее актуальных направлений является изучение системы врожденного иммунитета и, в частно-

сти, группы Toll-подобных рецепторов (TLR) [1,6], которые осуществляют распознавание молекулярных паттернов, ассоциированных с различными микроорганизмами, запуская эффекторные механизмы врожденного иммунитета [14,15]. Врожденный иммунитет является первой линией защиты организма от патогенов. Активация TLR приводит к индукции широкого спектра биологических реакций, в том числе, синтеза провоспалительных цитокинов и Т-клеточной активации, определяющей развитие адаптивного иммунного ответа [4, 7].

Цель исследования – оценить показатели естественного и адаптивного иммунитета к H.influenzae типа b в пуповинной крови у новорожденных детей в зависимости от отягощенности инфекционного анамнеза их матерей.

Материалы и методы

Проведено обследование 180 новорожденных, родившихся от женщин активного репродуктивного периода в возрасте от 18 до 44 лет (средний возраст 27,2 $\pm$ 0,7) в МБУЗ «Родильный дом №2» г. Ростова-на-Дону.

Исследование факторов естественного иммунитета

Материалом для исследования явилась пуповинная кровь, в которой определяли уровень экспрессии TLR2, TLR4 и продукции провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО α в супернатантах культур клеток под влиянием полисахаридной конъюгированной вакцины для профилактики инфекций, вызываемой H.influenzae типа b (ХИБ-инфекции) Акт-Хиб («Санофи Пастер», Франция). Оптимальная доза вакцины была выбрана на основании результатов предварительного исследования. Анализ экспрессии TLR2, TLR4 проводили на многофункциональном ридере «Synergy TM2». Оценивали среднюю интенсивность флуоресценции, величину которой выражали в условных единицах флуоресценции (у.е.). Спонтанную выработку цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО α определяли, культивируя МНК в полной культуральной среде RPMI 1640 без добавления стимуляторов. Продукцию цитокинов исследовали в супернатантах культур клеток методом ИФА (иммуноферментные тест-системы фирмы «Вектор-Бест», г. Новосибирск).



Исследования факторов адаптивного иммунитета

В сыворотке пуповинной крови новорожденных определяли содержание IgG к белкам наружной мембраны *H.influenzae* при помощи иммуноферментного анализа (ИФА) [13].

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 и обсуждение

На основании данных анамнеза матерей обследованных детей были выделены две клинические группы новорожденных: I – рожденные от женщин с отягощенным инфекционным анамнезом (140 чел.), II – рожденные от матерей с благоприятным инфекционным анамнезом (40 чел.). У матерей новорожденных I группы были верифицированы различные инфекционно-воспалительные заболевания во время беременности: у 30 чел. (16,7%) из них наблюдали один или несколько эпизодов ОРЗ с развитием острых или обострением хронических очагов инфекции ЛОР органов; у 75 чел. (41,7%) - наличие острых или обострения хронических инфекционно-воспалительных заболеваний органов мочеполовой системы; у 35 чел. (19,4%) одновременно были зарегистрированы воспалительные изменения со стороны органов дыхательной и/или мочеполовой систем.

При исследовании факторов естественного иммунитета у новорожденных I и II групп было установлено, что при стимуляции клеточной культуры МНК вакцинным препаратом Акт-Хиб через 24 часа антигенного

воздействия наблюдали увеличение уровня экспрессии TLR2, TLR4 в обеих клинических группах. При исследовании влияния вакцины Акт-Хиб на уровень экспрессии TLR2, TLR4 и продукции цитокинов ФНО α , ИЛ-1 β , ИЛ-6 рассчитывали коэффициенты стимуляции (КС). За единицу принимали уровень спонтанной экспрессии TLR и продукции цитокинов. КС рассчитывали как отношение показателей стимулированной экспрессии TLR2, TLR4 и концентрации цитокинов в супернатантах МНК к спонтанной, что позволило определить их прирост и повысить стандартизацию метода.

При определении средних значений КС было установлено, что вакцина Акт-Хиб оказывала незначительный стимулирующий эффект на уровень экспрессии TLR в двух исследуемых группах (табл. 1). Необходимо отметить, что не было выявлено различий между значениями КС у детей I и II клинических групп. Вместе с тем, не было установлено различий при рассмотрении КС между TLR2 и TLR4.

Более информативным оказалось определение функциональной активности TLR по величине КС продукции цитокинов в стимулированной культуре МНК. Показатели КС продукции ИЛ-1 β были выше при использовании вакцины Акт-Хиб в I группе детей с отягощенным анамнезом ($p < 0,05$) по сравнению со II группой детей с благоприятным инфекционным анамнезом. В отношении ИЛ-6 были установлены аналогичные изменения: КС у новорожденных I группы составил $8,60 \pm 4,6$ и был выше, чем у детей II группы ($1,80 \pm 0,6$) ($p < 0,05$). Достоверных различий в синтезе ФНО α , индуцированном препаратом Акт-Хиб, получено не было (табл. 1).

При оценке факторов адаптивного иммунитета по содержанию антител IgG к *H.influenzae* типа b у новорожденных I и II групп было установлено, что их уровень у детей I группы с отягощенным анамнезом был ниже ($p < 0,05$), чем у детей II группы с благоприятным инфекционным анамнезом (табл. 1).

Таблица 1

Средние значения коэффициента стимуляции (КС) при использовании полисахаридной конъюгированной вакцины для профилактики Hib-инфекции и показатели IgG-антител к *H.influenzae* типа b

Показатель	I группа детей с отягощенным инфекционным анамнезом	II группа детей с благоприятным инфекционным анамнезом
Значения КС		
TLR2	$1,24 \pm 0,08$	$1,44 \pm 0,10$
TLR4	$1,27 \pm 0,07$	$1,30 \pm 0,10$
ИЛ-1 β	$1,67 \pm 0,5^*$	$0,80 \pm 0,20$
ИЛ-6	$8,60 \pm 4,6^*$	$1,80 \pm 0,6$
ФНО α	$1,60 \pm 0,4$	$1,10 \pm 0,1$
IgG-антитела (y.e.)	$40,5 \pm 3,2^*$	$52,0 \pm 3,0$

* - достоверность различий ($p < 0,05$) между показателями у детей I и II групп



Полученные данные позволили установить, что стимуляция полисахаридной конъюгированной вакциной Акт-Хиб МНК детей обеих клинических групп оказывала незначительный стимулирующий эффект на уровень экспрессии TLR2 и TLR4 вне зависимости от отягощенности инфекционного анамнеза. Вместе с тем, их функциональная активность, оцениваемая по уровню синтеза провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β и ИЛ-6, была достоверно выше у детей, рожденных от матерей перенесших различные инфекционно-воспалительные заболевания во время беременности. Выявленный в нашем исследовании дисбаланс в системе цитокинов, вероятно, имеет важное прогностическое и диагностическое значение при развитии различных инфекционных заболеваний у новорожденных и детей грудного возраста.

Изменения в адаптивном звене характеризовались более низким уровнем IgG-антител к *H.influenzae* типа *b* у детей I группы, рожденными от женщин с отягощенным инфекционным анамнезом, по сравнению с детьми II группы от женщин с благоприятным анамнезом.

Низкое содержание антител к *H.influenzae* при высоких значениях провоспалительных цитокинов дает основание предположить о готовности организма ребенка к развитию воспалительных реакций при воздействии патогенного фактора. Данный признак может рассматриваться как ранний маркер риска развития гемофильной инфекции у детей, рожденных женщинами с отягощенным инфекционным анамнезом, что свидетельствует в пользу несомненной важности проведения специфиче-

ской иммунопрофилактики ХИБ-инфекций у них на первом году жизни.

Выводы:

1. При характеристике естественного иммунитета установлено увеличение синтеза ИЛ-1 и ИЛ-6 ($p<0,05$) в супернатантах культур клеток пуповинной крови при воздействии вакцинного препарата Акт-Хиб при более низких показателях адаптивного иммунитета - специфических IgG-антител ($p<0,05$) у новорожденных с отягощенным инфекционным анамнезом их матерей, по сравнению с детьми, рожденными от матерей не имевших инфекционно-воспалительных заболеваний во время беременности.
2. Низкий уровень противогемофильных антител при повышенной активности провоспалительных цитокинов в пуповинной крови может рассматриваться как фактор потенциальной угрозы, предрасполагающий к развитию ХИБ-инфекции у новорожденных и детей грудного возраста.
3. Наличие отягощенного инфекционного анамнеза у женщин во время беременности в сочетании с вышеуказанными показателями трансплацентарного врожденного и адаптивного иммунитета дают основание относить их новорожденных детей к группе риска развития ХИБ-инфекции и быть использованы при персонализированных подходах к проведению вакцинации против данной инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Байракова А.Л., Воропаева Е.А., Егорова Е.А., Метельская В.А., Гречишников О.Г., Афанасьев М.С., Рубальский О.В. Роль и биологическое значение Толл-подобных рецепторов в антиинфекционной резистентности организма // Вестник Российской АМН.- 2008.-№1.-С.45-54.
2. Гайворонская А.Г. Гемофильная инфекция у детей // Педиатрическая фармакология. - 2008.- Т.5, №1.- С.26-33.
3. Гайворонская А.Г., Ботвиньева В.В., Федосеенко М.В. Вакцинация против гемофильной инфекции типа *b* детей с различными отклонениями в состоянии здоровья // Медицинский вестник Северного Кавказа.- 2010. - №3.- С.16-17.
4. Ганковская О.А., Зверев В.В. Взаимодействие вирусов и Толл-подобных рецепторов. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.-2010.-№ 2.-С.101-105.
5. Гульман Л.А., Кутищева И.А., Карасев А.В. Клинико-этиологическая характеристика бактериальных гнойных менингитов у детей // Актуальные проблемы педиатрии: матер. науч.-практ. конф. Красноярск.-2008.-С.-39-42.
6. Ковальчук Л.В. Исследование экспрессии генов цитокинов в процессе культивирования лейкоцитов здоровых доноров. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2012.-№2.-С.- 60-63.
7. Ковальчук Л.В., Никонова А.С., Хорева М.В., Юдин А.А., Греченко В.В. Кардиоиммунные взаимодействия на основе рецепторов врожденного иммунитета: состояние вопроса, перспективы развития // Вестник РГМУ.-2010.-№1.-С.11-18.
8. Костинов М.П., Лавров В.Ф. Вакцины нового поколения в профилактике инфекционных заболеваний (издание 2-е, дополненное). М.: МВД, 2010.- 192 с.
9. Костинов М.П., Мещерякова А.К., Фошина Е.П., Тарбаева Д.А., Сависко А.А., Зайцева Е.В. Клиническое течение острой респираторной инфекции и состояние микробиотоза верхних дыхательных путей у беременных // Журн. Микробиологии.-2012.-№5.-С.12-16.
10. Маркова Т.П. Нарушения естественного и адаптивного иммунитета у часто болеющих детей. // Росс. аллергол. журнал.- 2007.- №3.-С.374-375.
11. Николаев М.К., Платонов А.Е. Изучение заболеваемости Ниб менингитами на территории Российской Федерации // Вестник Российской военно-медицинской академии; приложение.-2008.-№2.-С.384-385.
12. Покровский В.И., Таточенко В.К. Гемофильной инфекции типа *b* // Эпидемиология и инфекционные болезни.- 2005.- №1.-С.41-43.
13. Ястребова Н.Е. Результаты мониторинга антибактериальных и противотканевых антител у здоровых и больных различными заболеваниями людей // Журнал микробиологии.- 2007.-№3.-С.42-47.
14. Awomoyi A.A., Rallabhandi P., Pollin T.I., Lorenz E., Sztein M.B., Boukhvalova M.S., Hemming V.G., Blanco J.C., Vogel S.N. Association of TLR4 polymorphisms with symptomatic respiratory syncytial virus infection in high-risk infants and young children // J. Immunol.-2007.-Vol.5.-P.3171-3177.
15. Blasius A.L., Beutler B. Intracellular toll-like receptors // Immunity.-2010.- Vol. 32(3).-P.305-315.
16. WHO. Haemophilus influenzae b (Hib) vaccine introduction: WHO Regional Office for Europe, 2005.

ПОСТУПИЛА 04.05.2014