

# Методика и возможности прижизненной ликворологической оценки церебральной эндотелиальной деструкции при энтеровирусном менингите

В.В. Пилипенко, И.А. Вознюк, М.В. Клур, В.Е. Карев, А.В. Семенов

*Санкт-Петербургская медицинская академия последипломного образования;*

*Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова;*

*Научно-исследовательский институт детских инфекций ФМБА (Санкт-Петербург)*

*С использованием экспертных иммуногисто-цитохимических методов показано наличие циркулирующих десквамированных эндотелиоцитов (ДЭ) в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) у 30 больных энтеровирусными серозными менингитами с циклическим неосложненным течением заболевания. Определено количество ДЭ в остром периоде болезни. Доказана возможность количественного определения ДЭ в мазках ЦСЖ, окрашенных гематоксилином. Установлено, что в ЦСЖ лиц среднего возраста, подвергшихся плановым операциям под эпидуральной анестезией (группа контроля), ДЭ не определяются.*

**Ключевые слова:** энтеровирусный менингит, цереброспинальная жидкость, циркулирующие эндотелиоциты

**В** общей структуре нейроинфекционной патологии на долю менингитов и энцефалитов приходится более 60–70% случаев [2, 3]. Актуальность их исследования обусловлена частым развитием витальных осложнений в раннем периоде заболевания, высоким процентом летальных исходов [2, 7, 8, 11, 13] при ряде нозологических форм, а также формированием у выживших больных тяжелых резидуальных последствий [1, 3, 7–9, 11, 13, 17].

Современные данные [1, 7, 10, 16, 18] свидетельствуют об эндотелиальной тропности ряда возбудителей нейроинфекций (клещевой энцефалит, герпетический HSV-I/II энцефалит, энтеровирусная инфекция и др.). Среди патогенетических механизмов поражения ЦНС при различных бактериальных и вирусных инфекциях значительную роль играет поражение церебральных сосудов, в первую очередь эндотелиоцитов, как на стадии проникновения возбудителя в субарахноидальное пространство [1, 4, 7–9, 14–18], так и на стадии воспаления оболочек и паренхимы головного мозга (ГМ).

Известная анатомо-физиологическая автономность ЦНС, невозможность прижизненной морфологической оценки тканевых изменений в оболочках и паренхиме ГМ при рассматриваемой патологии, ограниченная доступность современных томографических методов нейровизуализации (МРТ и КТ), требующих специального программного оснащения, а также ряд других объективных причин существенно затрудняют возможности инструментальной оценки эндотелиальной дисфункции. Прежде всего, это касается наиболее тяжелой ее стадии — стадии деструкции эндотелия. При этом доказано, что причинами эндотелиальной дисфункции могут быть различные факторы: ишемия (гипоксия) тканей, возрастные изменения, свободно-радикальное повреждение, дислиппротеинемия, гипер-

гликемия, действие цитокинов и др., — что наблюдается при многих заболеваниях, в том числе инфекционных [5, 6, 9, 15, 16, 18].

Определение различных лабораторных маркеров эндотелиальной дисфункции — фактора Виллебранда, Р-селектина, тканевого активатора плазминогена (t-PA), эндотелина-1, ICAM-1, VCAM-1, Е-селектина и ряда других, с учетом, что эти вещества продуцируются не только системой эндотелиальных клеток [5, 6], также не может использоваться в качестве единственного критерия для оценки выраженной дисфункции эндотелия.

Одним из прямых маркеров повреждения эндотелия является степень его десквамации [5, 6, 12], которая оценивается по количеству циркулирующих десквамированных эндотелиоцитов (ДЭ) в крови по методике Nladovec et al. (1978) в модификации Петрищева и др. (2001) [5, 6, 12]. Кроме того, десквамация эндотелия может рассматриваться как один из клеточно-тканевых маркеров собственно альтернативного васкулита.

В ряде отечественных публикаций последних лет указывается на увеличение циркулирующих в крови ДЭ при различной патологии — инфаркте миокарда, сердечно-сосудистой недостаточности, онкологической патологии и др. [6, 12]. Так, например, в крови больных с ИБС, осложненной сердечной недостаточностью, содержание ДЭ в крови достигало 38 клеток на 100 мкл. По данным нескольких публикаций, в крови практически здоровых лиц количество ДЭ колеблется от 3 до 12 клеток в 100 мкл [5, 6].

Все изложенное выше определило цель нашего исследования: с использованием экспертных иммуноцитохимических (ИЦХ) и иммуногистохимических (ИГХ) методов

доказать возможность определения ДЭ в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) больных менингитами, для чего адаптировать известную методику определения ДЭ в крови [5, 6, 12] для выявления и количественной оценки ДЭ в ЦСЖ больных менингитами.

### Характеристика больных и методы исследования

Объектом исследования стали 30 проб ЦСЖ 30 взрослых больных вирусными серозными менингитами энтеровирусной этиологии (ВМ), полученных в периоде разгара заболевания при выполнении диагностической люмбальной пункции. Больные находились на лечении в отделении нейроинфекций Городской клинической инфекционной больницы № 30 им. С.П. Боткина (Санкт-Петербург) в 2002–2003 гг. Диагноз энтеровирусной природы менингита был подтвержден обнаружением энтеровирусной РНК в ЦСЖ больных методом полимеразной цепной реакции.

Заболевание характеризовалось циклическим неосложненным среднетяжелым течением. Средний возраст больных составил 32,9 лет. В исследование вошли 18 женщин и 12 мужчин, не имевших фоновых хронических заболеваний. В качестве контроля были использованы пробы ЦСЖ 15 больных в возрасте 38–52 лет с паховыми и бедренными грыжами вне ущемления, подвергшихся в 2002 г. плановым хирургическим операциям под эпидуральной анестезией в различных хирургических стационарах Санкт-Петербурга. Всего было исследовано 45 образцов ЦСЖ.

Для определения ДЭ в ЦСЖ нами были выполнены два этапа исследования. В связи с тем, что в отечественной и зарубежной литературе не удалось найти сообщений о методиках выявления ДЭ в ЦСЖ, первым этапом стала отработка самой методики определения ДЭ в ЦСЖ на основании методики Hladovec et al. (1978) в модификации Петрищева и др. (2001). Следующий, второй, этап заключался в экспертной иммуноцитохимической (ИЦХ) и иммуногистохимической (ИГХ) идентификации эндотелиоцитов, в том числе ДЭ, в сравнении с положительным и отрицательным ИГХ/ИЦХ в контрольном исследовании.

В работе был использован диагностический набор для определения CD31+ клеток «CD31-label APAP Kit» (DakoCytomation En Vision System-AP, США), содержащий антитела, моноклональные (клон JC/70A) к человеческим CD31+ рецепторам эндотелиальных клеток сосудов, а также хромоген Fast Red-Substrate Chromogen (DakoCytomation EnVision System-AP, США), система визуализации LSAB 2 и хромоген DAB (DakoCytomation EnVision System-AP, США).

На **первом этапе** исследования ЦСЖ (1 мл) помещали в микропробирку и центрифугировали 10 мин при скорости 1500 об/мин.

С помощью дозатора удаляли надосадочную жидкость в количестве 900 мкл. Осадок ресуспендировали в оставшихся 100 мкл ЦСЖ.

Осадок наносили на два предметных стекла с адгезивной поверхностью. Полученные мазки высушивали при комнатной температуре.

Высушенные мазки фиксировались ацетоном, после чего отмывались от солей дистиллированной водой.

Стекла помещались в холодильник для последующего хранения при температуре  $-10^{\circ}\text{C}$ .

Из каждой пробы ЦСЖ изготавливались по два мазка, окрашенных гематоксилином (Г+), для сравнения с ИЦХ-окрашенными препаратами в ходе выполнения второго этапа исследования.

На **втором этапе** исследования мы применили ИГХ/ИЦХ-метод (описан выше) в соответствии с протоколом фирмы-изготовителя используемых наборов. В качестве положительного ИГХ/ИЦХ-контроля были использованы:

- прижизненные интраоперационные соскобы с интимы крупной артерии и ее резецированные фрагменты (больные прооперированы в клинике сердечно-сосудистой хирургии ВМА им. С.М. Кирова);
- посмертные соскобы с интимы аорты и ее срезы (их предоставила Городская клиническая инфекционная больница № 30, Санкт-Петербург).

Препараты положительного ИГХ-контроля толщиной 5 мкм изготавливались из парафиновых блоков после стандартной гистологической проводки. Предметные стекла с буккальными и конъюнктивальными соскобами, взятыми у четырех здоровых лиц, были использованы в качестве отрицательного ИЦХ-контроля. ИГХ/ИЦХ-мазки и гистологические препараты положительного и отрицательного ИГХ/ИЦХ-контролей изготавливались по той же методике.

**Ход исследования.** Предметные стекла с мазками ЦСЖ размораживались при комнатной температуре, однократно промывались дистиллированной водой, высушивались.

Один из двух дублированных мазков ЦСЖ окрашивался Г+, второй мазок подвергался ИЦХ-обработке, после чего стекла промывались дистиллированной водой, высушивались, заключались под покровное стекло посредством заключающей среды («Канадский бальзам»).

Подсчет ДЭ в мазках выполнялся в 100 полях зрения при увеличениях  $\times 400$  ( $\times 10$  окуляр,  $\times 40$  объектив) и  $\times 200$  ( $\times 10$  окуляр,  $\times 20$  объектив).

### Результаты

В мазках, приготовленных из ресуспендата ЦСЖ и окрашенных Г+, искомые клетки — циркулирующие ДЭ, достигали размера 10–12 мкм (рис. 1), располагались отдельно или мелкими скоплениями, имели округлую или полигональную форму, слабо базофильную неоднородную цитоплазму и пикнотичное базофильное ядро, как прави-

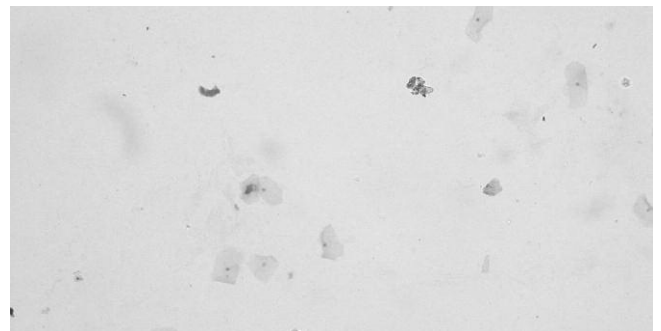


рис. 1: ДЭ в мазке ЦСЖ. Окраска гематоксилином, увеличение  $\times 200$

ло, расположенное в центре клетки. Часть ДЭ не имели ядра, цитоплазма таких клеток неоднородно прокрашивалась гематоксилином, а их контуры были неотчетливыми («тени» погибших клеток).

При анализе результатов реакций ИГХ/ИЦХ в качестве ДЭ признавались клетки, экспрессирующие на своей поверхности антиген CD31 в виде отчетливого специфического красного (при использовании Fast Red-Substrate Chromogen) или коричневого окрашивания (при использовании DAB Chromogen). Специфичность окрашивания была подтверждена отсутствием специфического окрашивания (негативный контроль) клеток в мазках, содержащих эпителиальные клетки (буккальный соскоб), а также отчетливым специфическим окрашиванием (позитивный контроль) эндотелиальных клеток в мазках-соскобах, взятых с внутренней поверхности аорты.

Микроскопическая картина ИЦХ-окрашенных мазков ЦСЖ, положительных и отрицательных ИЦХ/ИГХ-контролей представлена на рис. 2–6.

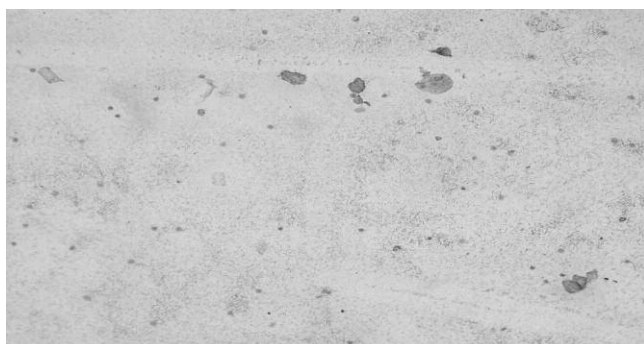


рис. 2: CD31+ (позитивные) ДЭ в мазке ЦСЖ. ИЦХ-метод, FR, увеличение x200

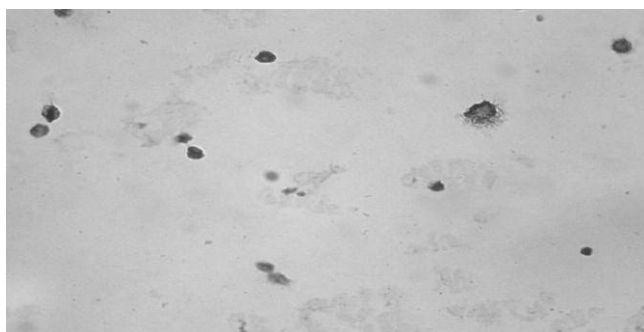


рис. 3: CD31+ (позитивные) ДЭ в мазке ЦСЖ. ИЦХ-метод, DAB, увеличение x200

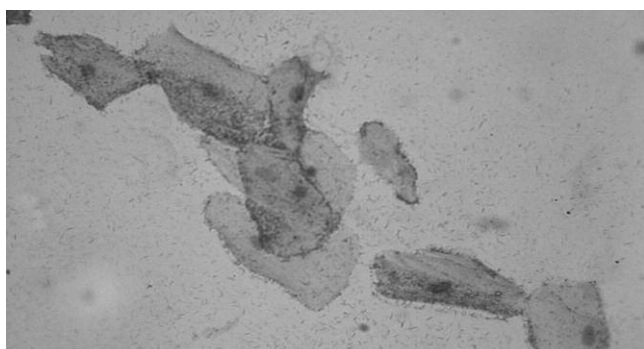


рис. 4: CD31+ (позитивные) эндотелиоциты в соскобе интимы аорты (позитивный ИЦХ-контроль). ИЦХ-метод, FR, увеличение x400



рис. 5: CD31- (негативные) эпителиоциты в буккальном соскобе (ИЦХ-негативный контроль). ИЦХ-метод, FR, увеличение x400

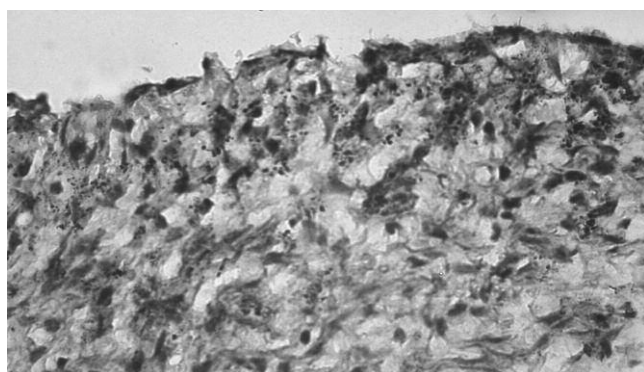


рис. 6: CD31+ (позитивные) эндотелиоциты интимы аорты (позитивный ИГХ-контроль). ИГХ-метод, FR, увеличение x400

В контрольной группе (n = 15) в мазках ЦСЖ ДЭ не были обнаружены. Расчет 95-процентного доверительного интервала вероятности случайного события с использованием точного метода Фишера показал, что при данной выборке доверительный интервал вероятности обнаружения ДЭ в ЦСЖ относительно здоровых лиц контрольной группы составляет 0–21,8%. Данный результат косвенно свидетельствует о высокой степени вероятности отсутствия ДЭ в ЦСЖ практически здоровых лиц.

Результаты однократного количественного определения ДЭ в крови и ЦСЖ больных ВМ и в группе контроля представлены в табл. 1.

Проведенный статистический анализ показал, что при сравнении числа ДЭ в Г+ и ИГХ-окрашенных мазках ЦСЖ получено статистически достоверное, очень высокое значение коэффициентов угловой и линейной корреляции — +0,98 (рис. 7).

При этом уровень ДЭ в мазках с окраской Г+ показывал устойчиво более высокое значение по сравнению с уровнем клеток в ИГХ-окрашенных препаратах. С помощью

таблица 1: Количество ДЭ в сыворотке крови и ЦСЖ больных ВМ и в контрольной группе

Показатель	Больные ВМ, n = 30	Контрольная группа, n = 15
ДЭ в сыворотке (в 100 мкл)	54,2 ± 7,7	3,4 ± 1,2
ДЭ-Г+ в ЦСЖ (в десяти полях зрения)	77,6 ± 15,2	–
ДЭК-CD <sub>31</sub> + в ЦСЖ (в десяти полях зрения)	66,2 ± 13,4	–

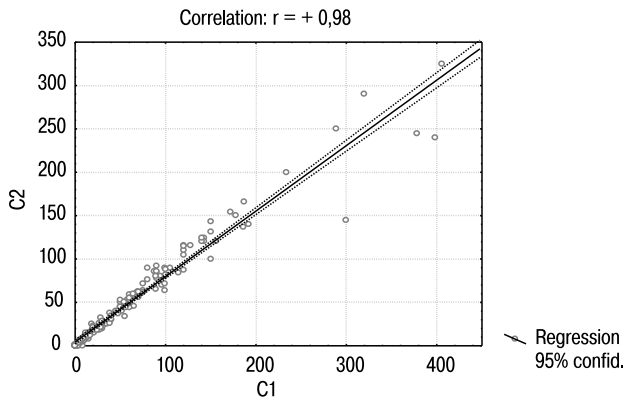


рис. 7: корреляционная взаимосвязь количества ДЭ в Г+-окрашенных мазках (С1) и ИЦХ-окрашенных мазках (С2) ЦСЖ

регрессионного анализа установлен коэффициент пересчета, составивший +1,2. Получено следующее регрессионное уравнение:

$$ДЭ1 = ДЭ2 / К,$$

где:

ДЭ1 — число ДЭ в ИГХ-окрашенных мазках (то есть более точное),

ДЭ2 — число ДЭ в Г+ окрашенных мазках,

К — коэффициент пересчета, равный 1,2.

Сопоставление числа ДЭ с величиной плеоцитоза ЦСЖ при однократном исследовании больных не выявило какой-либо взаимной зависимости.

Техническая сложность при выполнении ИГХ/ИЦХ-исследований, требующая определенных специальных навыков, а также необходимость специального диагностического набора для ИГХ/ИЦХ-исследования, значительно ограничивают возможность практического применения ИГХ-методики для определения ДЭ в ЦСЖ больных.

При сопоставлении числа ДЭ в Г+-окрашенных мазках ЦСЖ больных с таковым в ИГХ-окрашенных дубликатах-мазках ЦСЖ тех же больных выявлено отсутствие статистически достоверных различий ( $p > 0,05$ ) по тесту знаков и

критерию Вилкоксона. После введения коэффициента пересчета средняя разница числа ДЭ, определенного двумя методами (ИЦХ-окраской и Г+-окраской), составила  $0,7 \pm 0,9$  клеток, что подтверждает высокую степень достоверности предложенного метода Г+-окраски мазков для определения ДЭ в ЦСЖ. При этом метод подсчета ДЭ в Г+-мазках ЦСЖ прост в исполнении и не требует материальных и временных затрат, а коэффициент пересчета  $K = 1,2$  позволяет определить число ДЭ более точно.

## Обсуждение

Представленная методика определения ДЭ в ЦСЖ с использованием гематоксилинового окрашивания мазков ЦСЖ позволяет выявлять ДЭ в ЦСЖ. Она технически проста и может быть использована в рутинной инфекционной практике для прижизненной оценки выраженности деструкции эндотелия церебральных сосудов.

Факт обнаружения циркулирующих ДЭ в «воспаленной» ЦСЖ больных менингитами подлежит анализу с точки зрения анатомического строения гематоэнцефалического барьера. На наш взгляд, объяснение данному феномену следует искать прежде всего в значительных нарушениях анатомо-физиологической сохранности структуры гематоэнцефалического барьера в условиях воспаления, а также в возможной внесосудистой локализации эндотелиоцитов микроциркуляторного русла.

В подтверждение первого предположения можно привести результаты экспериментальных исследований, в частности работу Quagliariello et al. [15], где показано, что в условиях бактериального воспаления имеет место значительное увеличение образования пиноцитарных везикул в эндотелиальном слое и полное отделение 15–17% упругих внутриклеточных связей. Вместе с тем, дальнейшее изучение выраженности и динамики церебральной эндотелиальной деструкции, в том числе с использованием предлагаемой методики определения ДЭ в ЦСЖ, вероятно, может иметь практическое значение для оценки выраженности церебральной эндотелиальной дисфункции при инфекционной патологии, а также позволит дополнить наши сведения о патогенезе субарахноидального воспаления при нейроинфекциях.

## Список литературы

1. Борисов В.А., Малов И.В., Юшук Н.Д. Клещевой энцефалит. Новосибирск: Наука, 2002.
2. Королева И.С., Белошицкий Г.В. Менингококковая инфекция и гнойные бактериальные менингиты: руководство по лабораторной диагностике. М.: МИА, 2007.
3. Лобзин Ю.В., Пилипенко В.В., Громыко Ю.А. Менингиты и менингоэнцефалиты. СПб: ФОЛИАНТ, 2003.
4. Михайленко А.А., Покровский В.И. Отек-набухание головного мозга при коматозных состояниях у инфекционных больных. М: Медицина, 1997.
5. Петрищев Н.Н., Беркович О.А., Власов Т.Д. и др. Диагностическая ценность определения десквамированных эндотелиальных клеток в крови. Клини. лаб. диагностика 2001; 1: 50–52.
6. Петрищев Н.Н., Власов Т.Д. Физиология и патофизиология эндотелия. В кн.: Дисфункция эндотелия. Причины, механизмы,

фармакологическая коррекция (под ред. Н.Н. Петрищева). СПб: Изд-во СПбГМУ, 2003: 4–38.

7. Протас И.И. Герпетический энцефалит (клиника, патогенез, терапия). Руководство для врачей. Минск: МЕТ, 2000.
8. Сорокина М.Н., Иванова В.В., Скрипченко Н.В. Бактериальные менингиты у детей. М: Медицина, 2003.
9. Цинзерлинг В.А., Чухловина М.Л. Инфекционные поражения нервной системы: вопросы этиологии, патогенеза и диагностики. СПб: ЭЛБИ-СПб, 2005.
10. Barnes D.W., Whitley R.G. CNS diseases associated with varicella zoster virus and herpes simplex virus infection: Pathogenesis and current therapy. Neurol. Clin. 1986; 4: 265–283.
11. Branco R.G., Amoretti C.F., Tasker R.C. Meningococcal disease and meningitis. J. Pediatr. 2007; 83: 46–53.

12. Hladovec J., Prerovská I., Stanek V. et al. Circulating endothelial cells in acute myocardial infarction and angina pectoris. *J. Molec. Med.* 1978; 56: 1432–1440.

13. Lu C.H., Huang C.R., Chang W.N. et al. Community-acquired bacterial meningitis in adults: the epidemiology, timing of appropriate antimicrobial therapy, and prognostic factors. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 2002; 104: 352–358.

14. Luster I., McCracken G.H.Jr., Friedland I. Antibiotic pharmacodynamics in cerebrospinal fluid. *Clin. Infect. Dis.* 1998; 27: 1117–1129.

15. Quagliariello V.J., Long W.J., Scheld W.M. Morphologic alterations

of the blood-brain barrier with experimental meningitis in the rat. *J. Clin. Invest.* 1986; 77: 1084–1095.

16. Romero J.R. Diagnosis and management of enteroviral infections of the central nervous system. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 2002; 4: 309–316.

17. Rosenstein N.E., Perkins B.A., Stephens D.S. et al. Meningococcal disease. *New Engl. J. Med.* 2001; 344: 1378.

18. Scheld W.M., Koedel U., Nathan B. et al. Pathophysiology of bacterial meningitis: mechanism of neuronal injury. *J. Infect. Dis.* 2002; 186: 225–233. beta-1a in patients with MS and CIS. *Drugs Today* 2008; 44: 601–613.

## Method and possibilities of the *in vivo* CSF assessment of a cerebral endothelial destruction in patients with enteroviral meningitis

V.V. Pilipenko, I.A. Voznyuk, M.V. Klur, V.E. Karev, A.V. Semenov

*St-Petersburg Medical Academy of Postgraduate Education;  
Medical Military Academy named after S.M. Kirov;  
Research Institute of Children's Infections (St-Petersburg)*

**Key words:** enteroviral meningitis, cerebrospinal fluid, circulating endothelial cells

With the use of expert immunohisto/cytochemical methods in 30 patients with enteroviral serous meningitis and cyclic non-complicated disease course, the presence of circulating endothelial cells (CEC) in the cerebrospinal fluid (CSF) was shown. The CSF CEC quantity was determined in the acute period of illness.

It was confirmed the possibility for quantitative CEC detection in smears stained with hematoxylin. CEC in the CSF of hernioplastic patients operated under epidural anesthesia were not detected.

**Контактный адрес:** Пилипенко Василий Викторович — канд. мед. наук, доц. кафедры инфекционных болезней Санкт-Петербургской медицинской академии последипломного образования (СПбМАПО). Санкт-Петербург 191015, Кирочная ул., д. 41.  
Тел.: +7 (812) 717-64-96; e-mail: vpilipenko@mail.ru.

И.А. Вознюк — докт. мед. наук, зам. начальника кафедры нервных болезней по клинической работе Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова;

М.В. Клур — канд. мед. наук, асс. кафедры инфекционных болезней СПбМАПО;

В.Е. Карев — канд. мед. наук, зав. лабораторией патоморфологии НИИ детских инфекций ФМБА;

А.В. Семенов — канд. биол. наук, доц. кафедры клинической лабораторной диагностики СПбМАПО (Санкт-Петербург)