

УДК 616-036.11:612.112.9:616-092.18:571.27:[616.98:579.834.114]

DOI: 10.14427/jipai.2024.2.46

## Анализ функциональной активности мононуклеарных лейкоцитов периферической крови у больных острым иксодовым клещевым боррелиозом различной степени тяжести

Е.Н. Ильинских, О.В. Воронкова, Е.Н. Филатова, А.В. Решетова, Р.Р. Хасанова, И.Е. Есимова, Н.А. Чернышов, А.В. Ямпольская, О.В. Ямпольская, Н.С. Бужак, Е.В. Минакова

Сибирский государственный медицинский университет, Томск

## Analysis of mononuclear leukocyte functional activity in peripheral blood of patients with varying clinical severity of acute Lyme disease

E.N. Ilyinskikh, O.V. Voronkova, E.N. Filatova, A.V. Reshetova, R.R. Hasanova, I.E. Esimova, N.A. Chernyshov, A.V. Yampolskaya, O.V. Yampolskaya, N.S. Buzhak, E.V. Minakova

Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

### Аннотация

*Цель исследования* – анализ особенностей спонтанной и фитогемагглютинин(ФГА)-индуцированной пролиферативной и цитокинсекреторной активности в культурах мононуклеарных лейкоцитов периферической крови у больных острым иксодовым клещевым боррелиозом (ИКБ) в динамике до и сразу после антибиотикотерапии, а также в зависимости от степени тяжести заболевания.

*Материалы и методы.* У 18 и 14 пациентов с диагнозами лёгкой и средней степени тяжести острого ИКБ дважды в динамике в культурах мононуклеарных лейкоцитов была проанализирована интенсивность реакции бластной трансформации лимфоцитов (РБТЛ) и уровни секреции интерлейкинов (IL)-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-4, IL-10, IL-8, фактора некроза опухоли (TNF)- $\alpha$ , хемоаттрактантного белка моноцитов (MCP)-1, интерферона (IFN)- $\gamma$  и IFN- $\alpha$ .

*Результаты.* Клинически среднетяжёлое течение заболевания по сравнению с лёгкой формой было ассоциировано с существенным подавлением показателей РБТЛ, повышением спонтанной и/или ФГА-стимулированной продукции провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  и MCP-1, что было уравновешено усилением выработки противовоспалительных цитокинов IL-10 и IL-4. Подавление секреции IFN- $\gamma$  в этой группе больных сменялось увеличением его продукции в динамике, что в целом соответствовало формированию иммунного ответа по смешанному Th1/Th2 типу.

### Ключевые слова

Иксодовый клещевой боррелиоз, болезнь Лайма, цитокины, фитогемагглютинин, мононуклеарные лейкоциты, тяжесть течения.

### Summary

*The aim of the study* is to assess spontaneous and phytohemagglutinin (PHA)-induced proliferative and cytokine secretory activity in mononuclear blood cell cultures of patients with acute Lyme borreliosis (LB) over times before and after antibiotic therapy as well as depending on clinical severity.

*Materials and methods.* Activity of blast transformation reaction (BTR) of lymphocytes and the secretion levels of interleukins (IL)-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-4, IL-10, IL-8, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, interferon (IFN)- $\gamma$  and IFN- $\alpha$  were assessed twice over time in the cultures of mononuclear blood cells of 18 and 14 patients with mild and moderate severity of acute LB. *Results.* It was determined that the moderate clinical course of acute LB as compared with the mild course was associated with the significant suppression of BTR levels, the increases in spontaneous and/or PHA-stimulated production levels of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  and MCP-1, which were balanced by the increases in secretion levels of anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-4. The initial suppression of IFN- $\gamma$  secretion in this group gave way to an increase in its production over time, which generally corresponded to the formation of an immune response of the mixed Th1/Th2 type.

### Keywords

Lyme disease, borreliosis, cytokines, phytohemagglutinin, peripheral blood mononuclear cells, clinical severity.

## Введение

Иксодовые клещевые боррелиозы (ИКБ) – вызванные боррелиями *Borrelia burgdorferi sensu lato* (s.l.) природно-очаговые трансмиссивные инфекции с полиморфной клинической симптоматикой [1]. Клиническая картина ИКБ и исходы заболевания во многом зависят от состоятельности иммунного ответа хозяина на возбудитель, закономерности и механизмы формирования которого до сих пор остаются малоизученными [2,3].

Известно, что цитокины действуют комплексно в сложных сетях, и повышенная продукция одних цитокинов может способствовать снижению секреции других, что определяет их общий иммунорегуляторный эффект [4]. Исследование спонтанной и стимулированной поликлональными митогенами пролиферативной и цитокинсекреторной активности мононуклеарных лейкоцитов периферической крови в условиях *in vitro* в целом позволяет оценить их функциональный статус у пациентов с инфекционной патологией. Особенности изменений функциональной активности иммунокомпетентных клеток могут различаться у пациентов в динамике в зависимости от вирулентности возбудителя, клинической формы и тяжести течения болезни [4].

В современной литературе крайне мало исследований, посвящённых взаимосвязи между тяжестью течения или клинической формой острого ИКБ и показателями спонтанной или митогенстимулированной продукции цитокинов [5,6].

Показано, что *B. burgdorferi* s.l. в условиях *in vitro* и *in vivo* способны модулировать активность иммунных клеток, участвующих в реакциях как врождённого, так и адаптивного иммунного ответа для того, чтобы противостоять эрадикации, а экспрессия поверхностных протеинов Osp помогает боррелиям ускользнуть от иммунного ответа хозяина, возможно, за счёт угнетения фагоцитарной функции макрофагов и других механизмов [2,7]. Взаимодействие Toll-подобных рецепторов 2 (TLR2) и TLR3, находящихся на поверхности мембран клеток, с Osp-липпротеинами боррелий приводит к активации макрофагов, моноцитов, лимфоцитов, нейтрофилов с последующей передачей сигналов через миелоидный фактор дифференцировки 88 (MyD88)-зависимые и MyD88-независимые пути и секрецией преимущественно провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин (IL)-6, IL-12, IL-1 $\beta$  и фактор некроза опухоли (TNF)- $\alpha$ , что обеспечивает формирование антигенспецифического иммунного ответа [8,9]. Более того, фагоцитоз боррелий приводит к активации эн-

досомально-локализованных TLR7/8 и TLR9-рецепторов и экспрессии интерферонов I типа, подобно тому, как это происходит при вирусных инфекциях [10,11].

**Цель исследования** – анализ особенностей спонтанной и фитогемагглютинин(ФГА)-индуцированной пролиферативной и цитокинсекреторной активности в культурах мононуклеарных лейкоцитов периферической крови у больных острым ИКБ в динамике до и сразу после антибиотикотерапии, а также в зависимости от степени тяжести заболевания.

## Материалы и методы

В исследовании приняли участие 32 пациента с диагнозами эритемной и безэритемной форм (ЭФ и БФ) острого ИКБ, которые были госпитализированы в инфекционную клинику Сибирского государственного медицинского университета (СибГМУ) Минздрава России в период 2021–2023 гг. Диагноз у 16 больных с ЭФ и у 16 больных с БФ острого ИКБ был подтверждён данными эпидемиологического анамнеза, результатами клинического и клинико-лабораторного обследования и сформулированы в соответствии с клинической классификацией Ю.В. Лобзина с соавт. [12].

В зависимости от тяжести клинических проявлений обследованные нами больные с ЭФ и БФ острого ИКБ были разделены на группу 1, включавшую 18 пациентов с лёгким течением (8 мужчин и 10 женщин; средний возраст: 43,40 $\pm$ 2,12 лет), и группу 2 из 14 больных со среднетяжёлым течением болезни (6 мужчин и 8 женщин; средний возраст: 45,10 $\pm$ 1,95 лет). Соотношение больных с ЭФ и БФ ИКБ в каждой из групп 1 и 2 были 1:1. Степень тяжести течения острого ИКБ оценивалась на основании симптомов максимальной высоты и продолжительности лихорадки [12]. Пациенты с лёгкой формой болезни имели средние значения максимальной температуры тела 37,52 $\pm$ 0,14 $^{\circ}$ C продолжительностью не более 1-3 дней, а у группы больных со средней степенью тяжести была зарегистрирована более продолжительная и умеренно высокая лихорадка – 38,50 $\pm$ 0,12 $^{\circ}$ C (p<0,001). Контрольная группа включала 13 условно-здоровых доноров крови, сопоставимых с основной группой по возрасту и полу (6 мужчин и 7 женщин; средний возраст: 46,34 $\pm$ 2,21 лет).

Лабораторная верификация диагноза острого ИКБ проводилась методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием тест-систем АО «Вектор-Бест» (Россия) на основании определения положительных результатов коэффициентов позитивности для специфических иммуногло-

булинов (Ig) классов М и G к *B. burgdorferi* s.l. в парных пробах сыворотки в день госпитализации пациента, а также в динамике через 14, 21 день, 3 и 6 месяцев. Кроме того, у всех обследованных больных был исключён клещевой энцефалит с помощью определения специфических IgM и IgG к вирусу клещевого энцефалита (АО «Вектор-Бест», Россия). Эти же методы были использованы в контрольной группе для исключения лиц, сероположительных по клещевым инфекциям. Кроме того, у больных ИКБ были исключены гранулоцитарный анаплазмоз человека и возвратная клещевая лихорадка, вызываемая *Borrelia miyamotoi*, методом полимеразной цепной реакции с применением наборов серии «РеалБест» (АО «Вектор-Бест», Россия).

Проведение исследования было одобрено этическим комитетом СибГМУ Минздрава России (протоколы № 9568 от 30.10.2023 г., № 9119/1 от 30.05.2022 г. и № 7939 от 21.10.2019 г.), а от всех его участников получено письменное добровольное информированное согласие.

Критерии включения пациентов с ИКБ в исследование: поступление в стационар в первую неделю от начала болезни, возраст от 19 до 60 лет, клиническое, эпидемиологическое и лабораторное подтверждение диагнозов ЭФ или БФ острого ИКБ, в том числе на основании обнаружения патогномичного признака для ЭФ ИКБ – мигрирующей эритемы диаметром более 5 см на месте присасывания иксодового клеща. Критериями исключения были отказ больного от участия в исследовании, беременность, сопутствующая инфекционная (ВИЧ-инфекция, туберкулёз и др.) и/или декомпенсированная фоновая соматическая патология.

Материалом для исследования служила периферическая венозная кровь, которую брали дважды в динамике: в день поступления пациента в стационар на первую неделю болезни и спустя 14 дней при выписке после курса антибиотикотерапии (цефтриаксон). Культуры мононуклеарных клеток были получены для оценки спонтанной и ФГА-стимулированной пролиферативной активности в реакции бластной трансформации лимфоцитов (РБТЛ) морфологическим методом и для определения в кондиционной среде уровней спонтанной и ФГА-индуцированной продукции интерлейкинов IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-4, IL-10, IL-8 (хемокина CXCL8), TNF- $\alpha$ , хемоаттрактантного белка моноцитов MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1 или хемокина CCL2), интерферонов (IFN)- $\gamma$  и IFN- $\alpha$  методом ИФА (АО «Вектор-Бест», Россия). Кроме того, рассчитыва-

ли индекс стимуляции (ИС) как отношение показателя интенсивности митоген-стимулированной пролиферации мононуклеарных клеток или продукции цитокина в культуральных супернатантах к соответствующим спонтанным уровням.

Для РБТЛ гепаринизированную венозную кровь в соотношении 1:4 смешивали с питательной средой (90% среды RPMI-1640 с L-глутамином, 10% эмбриональная телячья сыворотка, 10 мг/мл гентамицина (ООО «БиолоТ», Россия); для стимуляции клеток в парные пробы вносили 10 мкг/мл ФГА («Sigma», США). Клеточные культуры инкубировали при 37°C и 5% концентрации CO<sub>2</sub> в течение 72 ч, после чего готовили окрашенные по Романовскому-Гимзе препараты, в которых анализировали число бластных форм лимфоцитов (%) [13]. Секрецию цитокинов исследовали в 24-часовых культурах мононуклеарных лейкоцитов, которые были выделены с помощью центрифугирования в градиенте плотности фикола (ООО «БиолоТ», Россия). Культуры инкубировали в полной питательной среде на основе RPMI-1640 без добавления (спонтанный уровень) или с индукцией 50 мкг/мл ФГА («Sigma», США).

Статистическую обработку результатов проводили с применением STATISTICA 12.0 («StatSoft», США). Данные, не подчинявшиеся нормальному закону распределения в тесте Шапиро-Уилка, были представлены как медиана (Me) и первый и третий квартили – (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>). Для анализа различий между выборками в независимых группах использовали непараметрический метод – U-критерий Манна-Уитни [14]. Для статистического анализа параметров в связанных группах в динамике применялся критерий Вилкоксона. Ранговая корреляция Спирмена была использована для корреляционного анализа. Критическое значение уровня статистической значимости было равно  $p < 0,05$ .

### Результаты исследования

Установлено, что в первую неделю болезни интенсивность спонтанной и ФГА-стимулированной РБТЛ в культурах мононуклеарных клеток у больных со средней степенью тяжести течения острого ИКБ составила 5,00 (4,50–6,25)% и 38,0 (31,8–43,3)%, что было существенно ниже, чем у пациентов с лёгким течением ИКБ – 9,3 (8,3–10,3)% и 59,0 (50,3–72,0)% ( $p < 0,001$  в обоих случаях), а также по сравнению с соответствующими значениями в группе условно-здоровых лиц – 6,25 (5,50–7,00)% и 62,0 (55,5–67,5)% ( $p < 0,001$  во всех случаях). Индексы стимуляции

лимфопротекции у больных ИКБ с лёгким и среднетяжёлым течением также были снижены – 6,80 (5,85–7,52) и 7,50 (6,25–8,00) по сравнению с контрольной группой – 10,0 (8,36–11,6) при  $p < 0,001$ , что указывало на подавление пролиферативного ответа, прежде всего, Т-лимфоцитов в культурах мононуклеарных лейкоцитов. Однако при изучении всех трёх показателей – спонтанной и ФГА-стимулированной РБТЛ, а также ИС, в динамике после курса терапии как у больных ИКБ из группы 1 с лёгким течением ИКБ – 7,50 (6,50–9,25)%, 61,5 (56,5–69,5)% и 8,20 (7,05–8,60)%, так и у пациентов из группы 2 со среднетяжёлым течением ИКБ – 6,50 (5,00–8,50)%, 58,5 (45,5–67,0)% и 9,10 (8,63–9,50)%, была установлена их нормализация через две недели до уровней, сопоставимых с соответствующими значениями в контроле ( $p > 0,05$  во всех случаях).

Кроме того, показано (табл. 1), что в начале заболевания пациенты со среднетяжёлым течением ИКБ имели по сравнению с больными с лёгким течением и группой здоровых доноров значительно более высокие уровни спонтанной секреции таких первичных провоспалительных цитокинов врождённого иммунного ответа, как IL-1 $\beta$  ( $p < 0,001$  и  $p < 0,001$ ), IL-6 ( $p < 0,001$  и  $p < 0,001$ ) и TNF- $\alpha$  ( $p < 0,001$  и  $p < 0,001$ ), а также хемокинов IL-8 (CXCL8) ( $p = 0,001$  и  $p = 0,007$ ) и MCP-1 (CCL2) ( $p = 0,001$  и  $p < 0,001$  соответственно).

В группе больных со среднетяжёлым течением ИКБ уровни спонтанной продукции большинства вышеперечисленных показателей в динамике через две недели оставались неизменно повышенными по сравнению с контрольной группой ( $p = 0,006$  для IL-1 $\beta$ ,  $p = 0,035$  для IL-6,  $p = 0,011$  для TNF- $\alpha$  и  $p < 0,001$  для MCP-1).

Анализ изменений этих показателей в начале заболевания у больных ИКБ с лёгкой степенью тяжести показал, что уровни спонтанной секреции цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  и MCP-1 не отличались от показателей здоровых доноров ( $p > 0,05$ ), а уровни IL-8 были даже достоверно ниже, чем в контроле ( $p = 0,002$ ).

У больных со среднетяжёлым течением ИКБ в начале болезни уровни ФГА-стимулированной секреции IL-6 и TNF- $\alpha$  в супернатантах культур мононуклеарных клеток были существенно выше, чем у пациентов с лёгкой формой заболевания ( $p = 0,013$  и  $p < 0,001$  соответственно). Кроме того, уровни митоген-индуцированной продукции TNF- $\alpha$  и MCP-1 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов в группе 2, имевших среднюю степень тяжести течения, в первую неделю болезни оказались значительно

выше по сравнению с соответствующими показателями у условно-здоровых лиц ( $p < 0,001$  в обоих случаях). Вместе с тем уровни ФГА-стимулированной секреции и ИС остальных цитокинов – IL-1 $\beta$ , IL-6 и IL-8 у больных ИКБ из групп 1 и 2 в начале заболевания и в динамике через две недели были существенно подавлены ( $p < 0,01$  или  $p < 0,001$  во всех случаях) или статистически значимо не отличались от контрольной группы ( $p > 0,05$ ), что свидетельствовало об относительном дефиците продукции этих провоспалительных цитокинов мононуклеарными клетками в первую неделю болезни, прежде всего у больных из группы 2. При этом через две недели повышенные уровни содержания ФГА-стимулированной продукции TNF- $\alpha$  в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов группы 2 существенно снижались в динамике ( $p = 0,012$ ) и были сопоставимы с контрольной группой ( $p > 0,05$ ).

В начале болезни в супернатантах клеточных культур вне зависимости от степени тяжести течения ИКБ в группах 1 и 2 уровни спонтанной секреции интерферона типа I IFN- $\alpha$  оказались значительно выше, чем соответствующий показатель в контроле ( $p < 0,001$  и  $p = 0,003$  соответственно). Статистически значимый рост этого показателя в группах 1 и 2 по сравнению с условно-здоровыми лицами сохранялся спустя две недели ( $p < 0,001$  в обоих случаях). Вместе с тем в начале болезни уровни ФГА-индуцированной продукции и ИС IFN- $\alpha$  в группах больных ИКБ с лёгким и среднетяжёлым течением были значительно подавлены по сравнению с соответствующими показателями у условно-здоровых лиц ( $p = 0,045$ ,  $p = 0,015$ ,  $p < 0,001$  и  $p < 0,001$  соответственно). Подавление уровней этих показателей у пациентов с острым ИКБ вне зависимости от степени тяжести сохранялись спустя 14 дней, что может говорить о нарушении интерферон-продуцирующей активности мононуклеарных клеток, полученных от больных, по сравнению со здоровыми донорами ( $p < 0,001$  во всех случаях).

Кроме того, установлено (табл. 2), что в начале болезни у пациентов, имевших среднетяжёлое течение ИКБ, уровень спонтанной секреции IL-10 в супернатантах культур мононуклеарных клеток был статистически значимо выше, чем у больных с лёгкой формой боррелиоза ( $p < 0,001$ ).

В группах 1 и 2 вне зависимости от степени тяжести заболевания уровни спонтанной и ФГА-стимулированной продукции IL-10 ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$ ,  $p = 0,023$  и  $p = 0,042$  соответственно) и IL-4 ( $p < 0,001$  во всех случаях) в супернатантах

**Таблица 1. Спонтанная и фитогемагглютинин-стимулированная секреция цитокинов врождённого иммунного ответа в культурах мононуклеарных лейкоцитов периферической крови больных с лёгким или среднетяжёлым течением острого иксодового клещевого боррелиоза в динамике в первую неделю болезни и спустя две недели, Ме (Q1-Q3)**

Показатель	Контрольная группа (n=13)	Больные ИКБ				
		Лёгкое течение (n=18)		Среднетяжёлое течение (n=14)		
		первая неделя	через 2 недели	первая неделя	через 2 недели	
к	1	2	3	4		
IL-1β	сп.	20,5 (9,12-25,0)	7,97 (3,43-8,79)	64,4 (1,79-67,8)^	319,7 (9,23-330,9)*#	135,5 (6,06-292,6)*
	ст.	472,5 (259,0-734,0)	108,4 (97,4-204,5)*	107,3 (63,2-109,1)*	178,9 (65,8-349,6)*	95,9 (46,2-261,6)*
	ИС	24,0 (14,5-37,6)	12,8 (10,3-59,67)	1,28 (0,65-60,48)*	1,07 (0,76-7,13)*#	4,39 (0,35-11,0)#
IL-6	сп.	220,2 (92,2-353,2)	287,5 (177,9-342,2)	440,5 (204,2-496,5)	570,4 (517,1-571,9)*#	415,3 (234,6-547,9)*^
	ст.	389,5 (210,3-755,5)	265,7 (196,2-467,4)	188,6 (135,8-556,9)	832,6 (297,7-891,0)#	560,1 (547,7-568,5)#
	ИС	1,57 (0,69-3,43)	1,11 (0,97-1,40)*	0,70 (0,33-1,93)	1,45 (0,59-1,56)*	1,04 (0,98-1,86)
TNF-α	сп.	3,30 (2,15-12,45)	4,40 (2,81-7,10)	14,55 (13,25-17,57)^	48,70 (41,65-70,18)*#	19,59 (15,34-40,11)*
	ст.	19,9 (13,2-58,4)	17,6 (7,11-24,3)	27,3 (22,8-28,1)	112,3 (110,5-117,7)*#	28,8 (23,2-34,3)^
	ИС	6,15 (1,51-7,53)	2,77 (1,87-4,98)	1,62 (1,30-1,86)*	1,72 (1,58-2,31)*	1,56 (1,42-2,24)*
IL-8	сп.	78,1 (58,6-344,9)	50,2 (41,8-90,9)*	104,8 (45,6-190,4)	191,9 (188,9-592,6)*#	186,5 (143,2-200,9)
	ст.	238,0 (122,0-406,8)	182,8 (134,3-193,8)*	179,1 (153,0-193,3)	181,56 (168,8-198,9)*	194,2 (186,3-203,4)
	ИС	1,30 (0,98-2,57)	2,67 (1,87-3,64)	1,86 (1,13-3,07)	0,95 (0,89-1,03)*#	1,01 (0,95-1,30)
MCP-1	сп.	213,1 (118,1-1520,3)	363,3 (165,6-725,9)	1250,0 (700,8-3250,0)*^	4276,0 (1395,0-4972,0)*#	3623,2 (384,5-5414,0)*
	ст.	1109,5 (743,2-618,2)	5171,0 (3162,0-5467,0)*	5486,0 (3426,0-5606,0)*	3761,0 (3052,0-5461,0)*	4043,0 (2582,0-5250,0)*
	ИС	7,42 (4,21-9,64)	14,2 (7,5-36,7)*	3,95 (0,97-20,9)	0,89 (0,48-1,43)*#	0,85 (0,64-1,73)*#
IFN-α	сп.	2,50 (2,0-3,6)	6,47 (5,60-8,33)*	7,08 (7,24-9,12)*	4,54 (4,01-7,75)*	7,89 (5,41-9,31)*
	ст.	5,50 (3,5-8,50)	3,66 (2,90-3,89)*	2,89 (2,32-3,45)*	4,01 (3,22-5,40)*	3,67 (2,55-4,48)*
	ИС	2,67 (1,30-2,65)	0,61 (0,44-0,84)*	0,45 (0,38-0,47)*^	0,79 (0,58-0,96)*	0,51 (0,43-0,74)*

Примечание (здесь и в табл. 2): сп. – спонтанный уровень; ст. – стимулированный фитогемагглютинином уровень; ИС – индекс стимуляции; \* – статистическая значимость различий показателей у больных ИКБ по сравнению с контрольной группой (pK-1,2,3,4<0,05), критерий Манна-Уитни; # – статистическая значимость различий показателей между группами больных ИКБ с лёгким и среднетяжёлым течением (p1-3<0,05 или p2-4<0,05), критерий Манна-Уитни; ^ – статистическая значимость различий показателей в динамике при госпитализации в первую неделю болезни и через две недели после курса терапии у пациентов с ИКБ с лёгким или со среднетяжёлым течением (p1-2 <0,05 или p3-4<0,05), критерий Вилкоксона.

**Таблица 2. Спонтанная и фитогемагглютинин-стимулированная секреция цитокинов Th1- и Th2-ассоциированного иммунного ответа в культурах мононуклеарных лейкоцитов периферической крови больных с лёгким или среднетяжёлым течением острого иксодового клещевого боррелиоза в динамике в первую неделю болезни и спустя две недели, Ме (Q1-Q3)**

Показатель	Контрольная группа (n=13)	Больные ИКБ				
		Лёгкое течение (n=18)		Среднетяжёлое течение (n=14)		
		первая неделя	через 2 недели	первая неделя	через 2 недели	
к	1	2	3	4		
IL-10	сп.	9,36 (2,45-12,7)	30,1 (24,1-37,2)*	23,2 (8,04-30,7)*	136,5 (97,6-173,2)*#	59,1 (48,5-76,4)*^
	ст.	27,4 (12,9-59,8)	85,6 (71,5-121,6)*	153,7 (53,6-337,4)*	114,1 (93,5-127,2)*	247,1 (162,0-267,3)*^
	ИС	4,72 (1,37-11,09)	2,37 (2,10-4,62)*	6,21 (1,81-20,71)	0,68 (0,65-0,73)*#	3,00 (2,12-4,52)#^
IL-4	сп.	2,92 (2,51-4,93)	30,9 (26,7-33,1)*	27,3 (15,4-31,9)*	28,4 (25,5-30,5)*	21,6 (17,4-23,9)*
	ст.	19,7 (10,2-22,3)	61,2 (47,0-75,4)*	55,2 (44,6-67,2)*	42,2 (42,1-77,3)*	52,7 (46,2-57,5)*
	ИС	4,00 (3,49-8,83)	2,24 (1,55-2,37)*	2,14 (1,76-2,77)*	1,65 (1,49-2,53)*	2,44 (2,23-2,80)*
IFN-γ	сп.	26,9 (9,5-43,6)	17,2 (13,4-27,1)	12,6 (8,08-25,7)	41,5 (15,9-43,4)	13,2 (12,4-35,4)
	ст.	25,6 (22,5-49,3)	57,4 (33,7-74,2)	58,3 (36,9-152,4)*	16,9 (16,3-23,4)#	106,7 (28,5-112,5)*^
	ИС	0,98 (0,51-4,85)	3,78 (2,11-4,70)	3,47 (2,06-7,73)	0,43 (0,41-0,56)*#	3,23 (1,69-4,76)^
IL-2	сп.	44,5 (32,7-112,1)	14,3 (10,8-16,8)*	12,7 (9,8-16,7)*	11,0 (10,0-14,9)*	12,6 (10,0-16,1)*
	ст.	93,5 (66,9-275,9)	27,6 (23,8-34,3)*	31,5 (23,9-34,1)*	28,9 (22,9-31,5)*	35,4 (25,4-42,9)*
	ИС	2,86 (1,57-5,52)	1,86 (1,65-2,62)*	2,04 (1,61-3,11)*	2,11 (2,09-2,20)*	2,54 (2,44-2,80)

культур мононуклеарных клеток были существенно повышены по сравнению с контрольной группой. В динамике через две недели уровни ФГА-стимулированной секреции и ИС IL-10 у пациентов со средней степенью тяжести течения ИКБ были достоверно выше, чем при поступлении в стационар ( $p=0,036$  и  $p=0,005$  соответственно).

В таблице 2 представлены данные, указывающие на то, что в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов, полученных от групп 1 и 2 больных ИКБ как до, так и после курса терапии, уровни спонтанной и ФГА-стимулированной продукции IL-2 были существенно ниже, чем у здоровых доноров ( $p<0,001$  во всех случаях). Вместе с тем уровни спонтанной секреции IFN- $\gamma$  у больных ИКБ статистически существенно не отличались от контрольной группы ( $p>0,05$ ). Больные ИКБ средней степени тяжести имели существенно более низкий уровень ФГА-стимулированной секреции и ИС IFN- $\gamma$  по сравнению с пациентами с лёгкой формой заболевания ( $p=0,016$ ) и группой здоровых доноров ( $p<0,001$ ). Вместе с тем в этой группе эти показатели, характеризующие секрецию IFN- $\gamma$ , имели тенденцию к росту в динамике после курса терапии ( $p=0,037$  и  $p=0,013$ ).

Диспансерное наблюдение за пациентами из групп 1 и 2, продолжавшееся в течение 12 месяцев после окончания курса антибиотикотерапии, не выявило признаков рецидива заболевания, что могло свидетельствовать о благоприятном исходе заболевания.

Корреляционный анализ выявил положительные корреляции между высотой лихорадки у больных острым ИКБ в первые дни болезни и уровнями ФГА-стимулированной продукции TNF- $\alpha$  ( $r=0,62$ ,  $p<0,001$ ) и IL-6 ( $r=0,60$ ,  $p=0,002$ ), уровнями спонтанной секреции IFN- $\alpha$  ( $r=0,54$ ,  $p=0,005$ ), IL-1 $\beta$  ( $r=0,58$ ,  $p=0,002$ ). Кроме того, у пациентов с острым ИКБ в начале заболевания были выявлены прямые корреляционные зависимости между интенсивностью спонтанной и ФГА-стимулированной РБТЛ и уровнями продукции IFN- $\gamma$  ( $r=0,64$ ,  $p<0,001$  и  $r=0,59$ ,  $p=0,002$ ) и IL-2 ( $r=0,54$ ,  $p=0,005$  и  $r=0,56$ ,  $p=0,003$ ) в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов, индуцированных и неиндуцированных ФГА соответственно. Обратная корреляционная зависимость была обнаружена у больных острым ИКБ между интенсивностью спонтанной и ФГА-стимулированной РБТЛ и уровнями спонтанной и ФГА-индуцированной продукции IL-10 ( $r=-0,62$ ,  $p<0,001$ ;  $r=-0,59$ ,  $p=0,002$ ).

## Обсуждение

Известно, что стимуляция антигенами боррелий *B. burgdorferi* s.l. культур мононуклеарных лейкоцитов периферической крови, полученных от здоровых доноров или больных с ранней стадией Лайм-боррелиоза, вызывает сильную провоспалительную реакцию клеток врождённого иммунного ответа и Т-хелперов 1 (Th1)-типа с преобладанием продукции таких цитокинов, как IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  [15], что, как предполагают, может играть ключевую роль в эрадикации возбудителя и исходе заболевания [16]. При Лайм-боррелиозе в исследованиях различных авторов [3,17,18] продемонстрирована тесная связь между клинической симптоматикой и выраженностью реакций врождённого и адаптивного иммунитета. Больные острым ИКБ, отличающиеся более тяжёлым течением заболевания по сравнению с лёгкой формой, имели в начале заболевания не только более выраженные проявления лихорадочно-интоксикационного и воспалительных синдромов, включая большее число симптомов и более высокие значения маркеров острой фазы воспаления, но и более существенное повышение уровней провоспалительных цитокинов в сыворотке крови, главным образом TNF- $\alpha$ , IL-18, IL-8 и IL-6 [17,18]. При этом концентрация IL-10 в сыворотке крови статистически значимо увеличивалась только у пациентов, имевших среднетяжёлое течение [18]. Кроме того, у больных острым ИКБ в супернатантах культур мононуклеарных клеток по сравнению с условно-здоровыми донорами были зарегистрированы повышенные уровни секреции провоспалительных цитокинов TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и/или IL-8 [5,19], а также регуляторного цитокина IL-10 [20,21], что также согласуется с полученными нами результатами, но только в группе пациентов ИКБ, имевших среднетяжёлое течение. Показано, что у больных острым ИКБ дисбаланс иммунного ответа с преобладанием реакции Th1-типа, сопровождающийся высокими концентрациями в сыворотке крови провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-8, IL-12 и др.) и подавлением активности секреторного ответа Th2-типа (IL-4), может быть связан с высоким риском диссеминации боррелий из первичного очага во внутренние органы и в ЦНС [2,6], в то время как смешанный ответ Th1/Th2 характерен для благоприятного течения и исхода острого ИКБ [22–24].

Вместе с тем у обследованных нами пациентов с острым ИКБ, имевших среднетяжёлое течение, по сравнению с больными с лёгкой формой и здоровыми донорами, в культурах

моноклеарных лейкоцитов было выявлено значительное подавление показателей пролиферативной активности лимфоцитов, ФГА-стимулированной секреции и ИС IFN- $\gamma$ , при одновременном повышении уровней продукции иммуносупрессорного цитокина IL-10, что в целом согласуется с результатами других авторов, полученными при сравнении этих показателей у больных ИКБ с контролем [5,6]. Кроме того, у всех больных острым боррелиозом вне зависимости от степени тяжести было продемонстрировано повышение базальной и митоген-индуцированной продукции противовоспалительного цитокина IL-4, антагониста ответа Th1-типа, и снижение секреции IL-2, то есть цитокина, который наряду с IFN- $\gamma$  играет важную роль в стимуляции пролиферации и эффектов T-лимфоцитов [4]. В проведённом нами исследовании связь между выявленным дефицитом продукции иммунорегуляторных цитокинов – IL-2 и IFN- $\gamma$ , при одновременном увеличении секреции IL-10 с одной стороны и подавлением уровней РБТЛ с другой стороны, подтверждалась выявленными нами корреляционными зависимостями.

По данным литературы, изучение динамики концентрации цитокинов в сыворотке крови больных с БФ и ЭФ ИКБ показало, что уровень провоспалительных цитокинов (TNF- $\alpha$ , IL-18) оказался наиболее высоким в начале заболевания, а концентрация IFN- $\gamma$  и противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-10), напротив, достигала максимальных значений в периоде реконвалесценции [22,25]. Такая динамика исследуемых цитокинов и пролиферативной активности лимфоцитов согласуется с полученными нами результатами и свидетельствует о развитии смешанного Th1/Th2 типа иммунного ответа с благоприятным исходом.

## Литература

1. Проворова В.В., Краснова Е.И., Хохлова Н.И. и соавт. Старые и новые клещевые инфекции в России. Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2019;8(2):102-112. doi:10.24411/2305-3496-2019-12013.
2. Bamm VV, Ko JT, Mainprize IL, et al. Lyme disease frontiers: reconciling borrelia biology and clinical conundrums. Pathogens. 2019;8(4):299. doi:10.3390/pathogens8040299.
3. Миноранская Н.С., Сарап П.В., Миноранская Е.И. Механизмы иммуноцитоклиновой регуляции в патогенезе иксодовых клещевых боррелиозов. Вестник РАМН. 2014;9-10:110-116.
4. Мерфи К., Уивер К. Иммунобиология по Джанвэю / под ред. Г.А. Игнатъевой, О.А. Свитич, И.Н. Дьякова. М.: Логосфера. 2020, 1184 с.
5. Лукашова Л.В., Карпова М.Р., Пирогова Н.П., и др. Функциональный статус моноцитов периферической кро-

## Заключение

Таким образом, впервые проведено изучение в динамике до и сразу после антибиотикотерапии закономерностей спонтанной и ФГА-стимулированной секреции широкого спектра цитокинов врождённого и адаптивного иммунного ответа в культурах моноклеарных лейкоцитов в зависимости от степени тяжести течения острого ИКБ. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в первую неделю болезни клинически более тяжёлое течение острого ИКБ сопровождается существенным подавлением пролиферативной активности лимфоцитов, которое, по-видимому, было ассоциировано с нарушением спонтанной и/или ФГА-стимулированной продукции иммунорегуляторных цитокинов – IL-2 и IFN- $\gamma$ . Тем не менее первоначальное подавление секреции IFN- $\gamma$  в группе больных со среднетяжёлым течением ИКБ сменялось увеличением его продукции в динамике. Кроме того, среднетяжёлое течение острого ИКБ отличалось от лёгкой клинической формы увеличением спонтанной продукции провоспалительных цитокинов – IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  и MCP-1, ростом ФГА-стимулированной секреции IL-6 и TNF- $\alpha$ , которое было сбалансировано повышением продукции иммуносупрессорного цитокина IL-10. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что у обследованных нами больных острым ИКБ вне зависимости от степени тяжести заболевания иммунный ответ формировался по смешанному Th1/Th2 типу, что, по-видимому, характеризует благоприятное течение и исход острого ИКБ.

**Источник финансирования.** Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 22-15-20010, <https://rscf.ru/project/22-15-20010/> и средств Администрации Томской области.

**Конфликт интересов.** Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ви у больных иксодовым клещевым боррелиозом на фоне описторхозной инвазии. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2006;2:81-83.

6. Бараулина А.С., Кологривова Е.Н., Жукова О.Б., и др. Особенности продукции цитокинов при хронизации иксодового клещевого боррелиоза. Бюллетень сибирской медицины. 2010;1:21-26.

7. Carrasco SE, Troxell B, Yang Y, et al. Outer surface protein OspC is an antiphagocytic factor that protects *Borrelia burgdorferi* from phagocytosis by macrophages. Infect. Immun. 2015;83:4848-4860.

8. Benjamin SJ, Hawley KL, Vera-Licona P, et al. Macrophage mediated recognition and clearance of *Borrelia burgdorferi* elicits MyD88-dependent and -independent phagosomal signals that contribute to phagocytosis and inflammation. BMC Immunol. 2021;22(1):32. doi:10.1186/s12865-021-00418-8.

9. Petnicki-Ocwieja T, Kern A. Mechanisms of *Borrelia burgdorferi* internalization and intracellular innate immune signaling. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014;4:175. doi:10.3389/fcimb.2014.00175.
10. Petzke MM, Brooks A, Krupna MA, et al. Recognition of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete, by TLR7 and TLR9 induces a type I IFN response by human immune cells. *J. Immunol.* 2009;183:5279-5292.
11. Cervantes JL, Hawley KL, Benjamin SJ, et al. Phagosomal TLR signaling upon *Borrelia burgdorferi* infection. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014 4 55. doi 10.3389/fcimb.2014.0005.
12. Лобзин Ю.В., Усков А.Н., Козлов С.С. Лайм-боррелиоз: иксодовые клещевые боррелиозы. СПб.: Фолиант. 2000, 156 с.
13. Самойлина Н.Л. Морфологический метод оценки бластной трансформации лимфоцитов в культуре с фитогемагглютинином. Лаб. дело. 1970;8:455-463.
14. Петри А., Сэбин К. Наглядная медицинская статистика / под ред. В.П. Леонова М.: ГЭОТАР-Медиа. 2015, 216 с.
15. Glickstein L, Moore B, Bledsoe T, et al. Inflammatory cytokine production predominates in early Lyme disease in patients with erythema migrans. *Infect Immun.* 2003;71(10):6051-6053. doi:10.1128/IAI.71.10.6051-6053.2003.
16. Скрипченко Н.В., Балинова А.А. Современные представления о патогенезе иксодовых клещевых боррелиозов. *Журнал инфектологии.* 2012;4 (2):5-14.
17. Soloski MJ, Crowder LA, Lahey LJ, et al. Serum inflammatory mediators as markers of human Lyme disease activity. *PLoS One.* 2014;9(4):e93243. doi:10.1371/journal.pone.0093243.
18. Шарифуллина Л.Д., Мурзабаева Р.Т., Гареев Е.М. Иммунологические особенности воспалительного процесса в остром периоде иксодовых клещевых боррелиозов. *Медицинский вестник Башкортостана.* 2017;12(5(71)):69-74.
19. Grygorczuk S, Pancewicz S, Zajkowska J, et al. Concentrations of macrophage inflammatory proteins MIP-1alpha and MIP-1beta and interleukin 8 (IL-8) in Lyme borreliosis. *Infection.* 2004;32(6):350-355. doi:10.1007/s15010-004-3110-4.
20. Пирогова Н.П., Новицкий В.В., Хлусова М.Ю., и др. Цитогенетический статус и фенотипические свойства лимфоцитов периферической крови у больных иксодовым клещевым боррелиозом. *Бюллетень сибирской медицины.* 2005;4(3):43-47.
21. Gautam A, Dixit S, Philipp MT, et al. Interleukin-10 alters effector functions of multiple genes induced by *Borrelia burgdorferi* in macrophages to regulate Lyme disease inflammation. *Infect Immun.* 2011;79(12):4876-92. doi:10.1128/IAI.05451-11.
22. Симакова А.И., Мандракова Н.В., Маркелова Е.В., и др. Цитокиновый профиль у больных с иксодовым клещевым боррелиозом. *Цитокины и воспаление.* 2004;3(4):21-23.
23. Пирогова Н.П., Карпова М.Р., Новицкий В.В., и др. Избранные вопросы состояния клеточных факторов резистентности при клещевых природно-очаговых микстинфекциях. *Бюллетень сибирской медицины.* 2006;5(S1):144-150.
24. Jarefors S, Janefjord CK, Forsberg P, et al. Decreased up-regulation of the interleukin-12Rbeta2-chain and interferon-gamma secretion and increased number of forkhead box P3-expressing cells in patients with a history of chronic Lyme borreliosis compared with asymptomatic *Borrelia*-exposed individuals. *Clin Exp Immunol.* 2007;147(1):18-27. doi:10.1111/j.1365-2249.2006.03245.x.
25. Мурзабаева Р.Т., Шарифуллина Л.Д., Абрашина Н.А. Клинико-иммунологическая характеристика эритемной и безэритемной форм иксодового клещевого боррелиоза. *Медицинский вестник Башкортостана.* 2021;16(3(93)):21-26.

### Сведения об авторах

- Ильинских Екатерина Николаевна – д.м.н., доцент, профессор кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии, ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск, Московский тракт, 2. E-mail: infconf2009@mail.ru. SPIN-код: 5245-5958, ORCID: 0000-0001-7646-6905.
- Воронкова Ольга Владимировна – д.м.н., доцент, заведующий кафедрой биологии и генетики, ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России. E-mail: Voronkova-ov@yandex.ru. SPIN-код: 8005-8110.
- Филатова Евгения Николаевна – аспирант кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России. E-mail: synamber@mail.ru. SPIN-код: 8094-3417.
- Решетова Алина Васильевна – аспирант кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России. E-mail: wind\_of\_change95@mail.ru. SPIN-код: 2690-1166.
- Хасанова Резеда Рахматулловна – к.м.н., доцент кафедры биологии и генетики, ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России. E-mail: hasanova\_rezeda@mail.ru. SPIN-код: 6850-5602.
- Есимова Ирина Евгеньевна – д.м.н., доцент кафедры биологии и генетики, ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России. E-mail: orevi@mail.ru. ORCID: 0000-0002-7508-2878, SPIN-код: 2245-6398.
- Чернышов Никита Алексеевич – аспирант кафедры биологии и генетики, ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России. E-mail: nchernyschov@mail.ru. SPIN-код: 7863-9900.
- Ямпольская Олеся Владимировна – студент ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России. E-mail: lesyapolskaya.01@mail.ru.
- Ямпольская Анастасия Владимировна – студент ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России. E-mail: nastya.yampolskaya13@mail.ru. SPIN-код: 7395-2856.
- Бужак Надежда Самсоновна – к.м.н., доцент кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии, ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России. E-mail: puchkovann@rambler.ru. SPIN-код: 7891-4992.
- Минакова Елизавета Вячеславовна – студент ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России. E-mail: yelizaveta.minakova.02@mail.ru.

Поступила 21.03.2024.