

Иммунология безэритематозной формы Лайм-боррелиоза на Среднем Урале

Лагерева Ю. Г., Беседина Л. Г., Дружинина А. Ю., Бейкин Я. Б.

Институт иммунологии и физиологии УрО РАН,

Диагностический Центр (лабораторной диагностики ВИЧ, инфекционной патологии и болезней матери и ребенка)

Резюме

Целью настоящего исследования являлось изучение роли факторов неспецифической резистентности и компонентов иммунного ответа в динамике острого периода безэритематозной формы Лайм-боррелиоза (БЭФ ЛБ). Для этиологической верификации ЛБ осуществляли диагностику с использованием иммуноферментных тест-систем для определения IgG и IgM антител к *Borrelia burgdorferi* ("NOVATEC Immunodiagnostica", Германия). Диагноз ЛБ считали серологически подтвержденным в ИФА в случае положительных результатов скрининга IgM в любой пробе крови и четырехкратного и более нарастания титра IgG при исследовании парных сывороток. В результате проведенных исследований было показано, что на ранних стадиях инфекционного процесса при БЭФ ЛБ развивается умеренная гранулоцитопения. Активация моноцитарного звена приводит к устойчивому повышению содержания моноцитов в периферическом кровотоке. Система адаптивного иммунитета реагирует на инфекцию Bb экспансией CD4⁺ субпопуляции Т-лимфоцитов. В динамике острого периода БЭФ ЛБ происходит смещение профиля цитокинового синтеза с первоначального Th1 на Th2.

Ключевые слова: безэритематозная форма Лайм-боррелиоза, неспецифическая резистентность, адаптивный иммунитет, Th1- и Th2-лимфоциты, цитокины

Лайм-боррелиоз - мультисистемное заболевание, возбудителем которого является грамотрицательная спиралевидная бактерия, относящаяся к семейству Spirochaetaceae, включающему три клинически значимых рода микроорганизмов *Treponema*, *Leptospira* и *Borrelia*. Род *Borrelia* включает виды, которые вызывают клещевой возвратный тиф (*B. recurrentis*, *B. duttoni*, *B. hermsii* и т.д.) и вызывающие Лайм-боррелиоз (*B. burgdorferi* комплекс или *B. burgdorferi sensu lato*) [1]. Переносчиками бактерий являются иксодовые клещи: *Ixodes ricinus* - в Европе и Азии, *Ixodes persulcatus* - в Восточной Европе и Азии, *Ixodes scapularis* и *Ixodes pacificus* - в Северной Америке [2]. На основании данных, полученных на животных моделях, заболевание после укуса клеща развивается в 7% (36 ч) до 75% (48 ч) случаев, в зависимости от длительности питания клеща. В 95% случаев инфекция имеет abortивное течение, ассоциированное с

сероконверсией, и лишь в 5% развиваются клинические симптомы заболевания, поражающего в основном кожу [1]. Мигрирующая эритема (МЭ) в дебюте заболевания встречается в 60-80% случаев [3] и в 60-80% случаев сопровождается синдромом инфекционного токсикоза [4, 5, 6]. Многочисленными исследованиями установлена значительная частота безэритематозной формы, составляющая от 20 до 45% [4, 7]. Отсутствие МЭ нередко ведет к ошибочной диагностике в раннем периоде, запоздалому проведению этиотропной терапии, способствует прогрессированию процесса и его хронизации.

Патогенетические механизмы ЛБ до конца не изучены. Поскольку заболевание может протекать бессимптомно, несмотря на выявление антигенов Bb, индуцируемые возбудителем иммунологические реакции, по-видимому, являются критическим фактором в развитии заболевания [17]. Bb, попав в макроорганизм, реагирует со множеством факторов неспецифической резистентности и адаптивного иммунитета хозяина. Ход заболевания во многом определяется взаимодействием

Лагерева Юлия Геннадьевна - зав. иммунологической лабораторией Института иммунологии и физиологии УрО РАН

спирохет и тканевых макрофагов. Фагоцитированные бактерии разрушаются, их фрагменты презентуются иммунной системе, запуская иммунный ответ. Взаимодействие боррелий с макрофагами также инициирует мощную воспалительную реакцию. В большинстве случаев происходит элиминация патогена уже на уровне неспецифического воспаления [1].

В формировании иммунного ответа важнейшую роль играют как гуморальные, так и клеточно-опосредованные реакции [8]. В регуляции иммунного ответа участвуют цитокины, секретируемые активированными Т-лимфоцитами. Экспериментальными исследованиями доказано, что чувствительность к Bb ассоциирована с Th1-профилем (интерферон- γ), в то время как Th2-продуцируемый интерлейкин 4 (IL4) предотвращает развитие клинической симптоматики и замедляет рост бактерий [9, 10]. Тем не менее, дифференцировка Т-лимфоцитов по Th1-пути под действием Bb описана как *in vitro*, так и *in vivo*: Т-лимфоциты инфицированных мышей продуцировали интерферон- γ (IFN γ) во время экспозиции с Bb [11], Т-клеточные клоны пациентов с ЛБ продуцировали Th1-цитокины, включая интерлейкин 2 (IL2), IFN γ и GM-CSF, но не IL4 или интерлейкин 5 [12]. Поэтому особый интерес представляют данные, характеризующие соотношение различных регуляторных Т-лимфоцитарных субпопуляций в динамике инфекции.

Цель настоящего исследования состояла в изучении роли факторов неспецифической резистентности и компонентов иммунного ответа, включая цитокиновый профиль Т-лимфоцитов, в динамике острого периода безрецидивной формы Лайм-боррелиоза.

Материалы и методы

Исследования выполнены в период пяти эпидемических сезонов ЛБ (2000-2004 гг.) на территории Среднего Урала. Для этиологической верификации Лайм-боррелиоза и микст-инфекции осуществляли диагностику с использованием иммуноферментных тест-систем для определения IgG и IgM антител к *Borrelia burgdorferi* ("NOVATEC Immunodiagnostica", Германия). Диагноз ЛБ считали серологически подтвержденным в ИФА в случае положительных результатов скрининга IgM в любой пробе крови и четырехкратного и более нарастания титра IgG при исследовании парных сывороток. БЭФ ЛБ была диагностирована у 20 человек. Средний возраст больных составил $40,4 \pm 4,6$ лет. Инкубационный период варьировал от 5 до 30 дней ($14,6 \pm 2,6$ дней). Укус клеща был

зарегистрирован у 19 больных, лесной фактор присутствовал в 1 случае. Группу контроля составили 15 условно-здоровых лиц, не предъявлявших на момент обследования жалоб и не имеющих хронических инфекционных и соматических заболеваний, подвергнутые аналогичным по объему исследованиям.

Иммунологическое обследование проводили в динамике острого периода на 1-7, 8-14, 15-21, 22-28 сутки от начала заболевания. Параметры общего анализа крови определяли с помощью гематологического анализатора Cobas Minos Stex (ABX). Иммунофенотипирование лимфоцитов проводили с использованием моноклональных CD3/CD19, CD3/CD4, CD3/CD8, CD3/CD16+56+ антител производства "IO Test" и анти-CD95, HLA-DR (НПЦ "Мед-БиоСпектр", г.Москва) методом проточной цитометрии на цитофлюориметре FACSscan ("Becton Dickinson"). Для оценки внутриклеточного синтеза цитокинов мононуклеары периферической крови получали путем выделения на градиенте плотности фиколла-верографина ($1,077 \text{ г/см}^3$). Спонтанную продукцию IL2, IL4, IFN γ и TNF α CD3- и CD3+лимфоцитами оценивали по истечении 4 часов инкубации в присутствии брeфельдина А при 37 °C, в атмосфере 5% CO₂. В качестве активатора для стимуляции внутриклеточного синтеза использовали PMA ("Sigma", 50 ng/ml) плюс иономицин ("Sigma", 1 mg/ml). Иммунофенотипирование проводили с использованием FITC-меченных CD3-моноклональных антител (ООО "Сорбент", г.Москва) и PE-конъюгированных анти-IL2, IL4, IFN γ и TNF α -антител ("Caltag"). Для оценки внутриклеточного киллинга (бактерицидной активности лейкоцитов, завершенности фагоцитоза) и поглотительной активности нейтрофилов и моноцитов использовались методы, разработанные в лаборатории клинической иммунологии Института иммунологии Минздрава РФ [13, 14]. Функционирование НАДФ-оксидазной системы нейтрофилов оценивали при помощи спонтанного НСТ-теста (Демин, 1981). Концентрации сывороточных иммуноглобулинов IgG, IgM, IgA в сыворотке крови определяли методом радиальной иммунодиффузии в агаре по Mancini. Содержание ЦИК оценивали методом преципитации в растворе ПЭГ-6000.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием модуля "Descriptive Statistics" ППП "NCCS 2001 and Pass Test" и модуля "Nonparametric Statistics" ППП "STATISTICA" (StatSoft Inc.). Для оценки значимости различий между средними величинами сравниваемых групп использовали U-критерий Манна-Уитни (Mann-Whitney U-test).

Таблица 1. Параметры фагоцитарной системы у больных БЭФ ЛБ в динамике острого периода заболевания

Показатель	Периоды обследования от начала заболевания									
	контроль		1-7 сутки 1		8-14 сутки 2		15-21 сутки 3		22-28 сутки 4	
	M	STD	M	STD	M	STD	M	STD	M	STD
Фагоцитарная активность нейтрофилов, %	90,65	4,05	95,74	3,00	94,51	4,00	95,92	1,96	95,82	1,66
Фагоцитарная активность нейтрофилов, $10^9/\text{л}$	3,05	0,73	2,09	0,98	2,36	1,42	2,17	1,14	2,43	1,47
Фагоцитарная активность моноцитов, %	68,83	6,68	86,56	9,92	85,70	11,53	87,56	4,52	87,65	8,63
Фагоцитарная активность моноцитов, $10^9/\text{л}$	0,178	0,046	0,307	0,178	0,307	0,269	0,301	0,151	0,378	0,305
Бактерицидная активность лейкоцитов	43,78	12,18	33,92	18,06	29,57	12,91	30,78	12,58	31,50	6,85
НСТ-тест спонтанный, %	15,27	11,80	19,50	9,87	15,18	9,94	12,66	13,92	15,33	7,65
НСТ-тест спонтанный, $10^9/\text{л}$	0,430	0,323	0,404	0,275	0,700	0,245	Нет дан-ных	Нет дан-ных	Нет дан-ных	Нет дан-ных

Результаты собственных исследований

БЭФ ЛБ характеризовалась на ранних этапах развития инфекции умеренной лейкопенией ($4,76 \pm 0,91 \cdot 10^9/\text{л}$). Достоверно повышаясь со второй недели от начала заболевания, общее количество лейкоцитов находилось на контрольном уровне в течение дальнейшего срока наблюдения. Лейкопения в 1-7 сутки была обусловлена снижением содержания в периферической крови гранулоцитов, также восстанавливающимся на 8-14 сутки. С первой недели заболевания было зарегистрировано увеличение относительного и абсолютного содержания моноцитов в периферической крови больных БЭФ ЛБ ($8,39 \pm 2,77 \cdot 10^9/\text{л}$ против $4,41 \pm 0,66 \cdot 10^9/\text{л}$ в контроле, $0,41 \pm 0,17 \cdot 10^9/\text{л}$ против $0,26 \pm 0,06 \cdot 10^9/\text{л}$, соответственно). Количество моноцитов оставалось статистически значимо повышенным до конца наблюдения. Количество фагоцитирующих нейтрофилов и моноцитов не изменялось в ходе наблюдения. Число НСТ-положительных нейтрофилов, а также процент завершенности лейкоцитарного фагоцитоза также оставались на уровне контрольных значений (табл. 1).

Абсолютное содержание лимфоцитов было незначительно снижено в 1-7 сутки от начала заболевания, далее повышаясь до контрольных значений. Анализ субпопуляционного состава лимфоцитов показал, что для больных БЭФ ЛБ было характерно увеличение как относительного, так и абсолютного содержания Т-лимфоцитов в течение всего периода обследования. Увеличение количества $\text{CD}3^+$ лимфо-

цитов происходило за счет Т-хелперов, абсолютное содержание которых заметно нарастало ко второй неделе от начала заболевания (табл. 2). Это приводило к статистически значимому увеличению соотношения $\text{CD}4/\text{CD}8$, снижающемуся, однако, уже на 15-21 сутки в связи с увеличением доли Т-цитотоксических лимфоцитов. Одновременно с Т-лимфоцитозом развивалась В-лимфопения, сохраняющаяся на протяжении всего периода обследования. Концентрация сывороточных иммуноглобулинов класса IgG также оставалась сниженной по сравнению с контрольной на протяжении всего периода наблюдения (табл. 3). Содержание иммуноглобулинов классов IgM повышалось по сравнению со стартовым показателем на второй неделе от начала заболевания, оставаясь на уровне контрольных значений. Содержание циркулирующих иммунных комплексов повышалось, параллельно нарастанию IgM, но из-за значительных индивидуальных колебаний показателя не достигло статистически значимой разницы.

Цитокиновый профиль Т-лимфоцитов больных БЭФ ЛБ характеризовался повышением спонтанного синтеза IFN γ , начиная с первой недели заболевания. В динамике спонтанного синтеза IL2 и TNF α Т-лимфоцитами наблюдались однонаправленные тенденции к увеличению числа IL2 и TNF α -синтезирующих Т-лимфоцитов ко второй неделе от начала заболевания (рис. 1). Количество Т-лимфоцитов, спонтанно продуцирующих IL4, у больных ЛБ повышалось на 15-21 сутки от начала заболе-

Таблица 2. Показатели гемо- и иммуноцитогаммы у больных БЭФ ЛБ в динамике острого периода заболевания

Показатель (M±σ)	Периоды обследования от начала заболевания									
	контроль		1-7 сутки 1		8-14 сутки 2		15-21 сутки 3		22-28 сутки 4	
	M	STD	M	STD	M	STD	M	STD	M	STD
Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	5,99	1,40	4,76	0,914	6,37	1,65	5,74	1,10	5,58	1,75
Гранулоциты, %	55,83	3,95	50,97	15,77	48,41	11,32	47,62	2,74	54,60	6,93
Гранулоциты, $10^9/\text{л}$	3,352	0,836	2,379	0,693	3,080	0,978	2,726	0,510	3,052	1,031
Моноциты, %	4,42	0,67	8,39	2,77	6,78	3,08	7,38	0,74	8,58	1,99
Моноциты, $10^9/\text{л}$	0,262	0,063	0,408	0,173	0,452	0,303	0,418	0,064	0,500	0,271
Лимфоциты, %	39,75	4,11	40,64	13,67	44,81	11,50	45,00	3,27	36,82	5,91
Лимфоциты, $10^9/\text{л}$	2,380	0,602	1,982	0,890	2,836	0,924	2,594	0,588	2,032	0,583
Т-лимфоциты (CD3+), %	69,58	6,08	76,73	8,60	80,30	6,06	80,30	4,84	77,60	6,63
Т-лимфоциты (CD3+), $10^9/\text{л}$	1,657	0,457	1,544	0,772	2,270	0,726	1,952	0,394	1,588	0,551
В-лимфоциты (CD19+), %	12,58	4,48	9,06	5,00	8,49	3,96	9,95	1,14	6,53	2,50
В-лимфоциты (CD19+), $10^9/\text{л}$	0,296	0,116	0,158	0,091	0,236	0,112	0,242	0,048	0,130	0,056
Т-хелперы (CD3+CD4+), %	44,67	4,56	50,93	10,14	52,34	6,19	46,47	10,01	44,08	6,68
Т-хелперы (CD3+CD4+), $10^9/\text{л}$	1,064	0,300	0,995	0,467	1,461	0,429	1,097	0,093	0,908	0,355
Т-цитотокс. (CD3+CD8+), %	20,50	4,12	19,38	3,48	18,72	2,88	23,75	4,49	21,70	3,27
Т-цитотокс. (CD3+CD8+), $10^9/\text{л}$	0,488	0,168	0,394	0,207	0,534	0,194	0,580	0,162	0,450	0,177
НК-клетки (CD3-CD16+56+), %	12,08	7,01	11,34	7,78	7,07	4,67	8,05	6,89	13,77	6,09
НК-клетки (CD3-CD16+56+), $10^9/\text{л}$	0,302	0,217	0,224	0,171	0,214	0,164	0,215	0,228	0,268	0,118

Таблица 3. Параметры гуморального иммунитета у больных БЭФ ЛБ в динамике острого периода заболевания

Показатель	Периоды обследования от начала заболевания									
	контроль		1-7 сутки 1		8-14 сутки 2		15-21 сутки 3		22-28 сутки 4	
	M	STD	M	STD	M	STD	M	STD	M	STD
IgG, г/л	14,77	4,80	9,68	2,85	9,96	2,04	10,18	2,00	10,38	1,86
IgM, г/л	2,13	0,72	1,94	1,21	2,80	1,00	2,82	0,54	2,62	0,70
IgA, г/л	1,82	0,74	1,64	0,89	1,85	0,20	1,31	0,33	1,14	0,23
ЦИК, ед.	76,75	32,30	66,16	29,75	86,81	3538	114,17	47,52	59,00	18,90

Таблица 4. Содержание gIFN-, TNF α -, IL2-, IL4-продуцирующих CD3+ и CD3- лимфоцитов у больных БЭФ ЛБ в динамике острого периода заболевания

Показатель	Периоды обследования от начала заболевания									
	контроль		1-7 сутки 1		8-14 сутки 2		15-21 сутки 3		22-28 сутки 4	
	M	STD	M	STD	M	STD	M	STD	M	STD
CD3+/gIFN+ спонт., %	1,41	1,25	3,16 рк<0. 05	1,81	2,60	2,38	3,23 рк<0.05	1,23	2,98	1,03
CD3+/gIFN+ спонт., 10 ⁹ /л	0,033	0,026	0,063	0,034	0,079	0,098	0,088	0,044	0,055	0,043
CD3+/gIFN+ стим., %	21,45	7,81	23,31	5,25	24,52	7,44	30,18	12,47	24,87	12,64
CD3+/gIFN+ стим., 10 ⁹ /л	0,499	0,194	0,494	0,192	0,664	0,214	0,810 рк<0.05	0,262	0,446	0,402
CD3+/TNF α + спонт., %	3,43	2,07	3,09	2,06	4,80	2,56	4,88	1,66	4,73	2,36
CD3+/TNF α + спонт., 10 ⁹ /л	0,083	0,057	0,074	0,072	0,127	0,065	0,138	0,065	0,097	0,079
CD3+/TNF α + стим., %	32,61	8,51	30,10	12,80	27,92	13,51	33,35	26,61	15,16 рк<0. 05	15,77
CD3+/TNF α + стим., 10 ⁹ /л	0,773	0,268	0,617	0,348	0,803	0,545	0,845	0,601	0,339	0,383
CD3+/IL2+ спонт., %	1,61	1,19	2,52	1,81	4,45 рк<0.0 5	3,93	4,26	4,38	4,21	3,66
CD3+/IL2+ спонт., 10 ⁹ /л	0,037	0,025	0,052	0,045	0,117 рк<0.0 5	0,086	0,135 рк<0.05	0,157	0,083	0,100
CD3+/IL2+ стим., %	27,85	10,14	22,99	7,24	23,45	16,02	19,83	20,61	16,30	7,59
CD3+/IL2+ стим., 10 ⁹ /л	0,636	0,231	0,453	0,107	0,586	0,323	0,542	0,464	0,301 рк<0. 05	0,108
CD3+/IL4+ спонт., %	1,06	0,63	1,44	0,87	1,46	0,96	3,71 рк<0.05	2,85	3,16 рк<0. 05	1,92
CD3+/IL4+ спонт., 10 ⁹ /л	0,024	0,013	0,032	0,026	0,043	0,035	0,100 рк<0.05	0,080	0,061	0,050
CD3+/IL4+ стим., %	2,81	1,81	3,55	2,25	3,30	2,07	7,10 рк<0.05	3,86	6,12 рк<0. 05	4,21
CD3+/IL4+ стим., 10 ⁹ /л	0,072	0,065	0,080	0,067	0,085	0,045	0,209 рк<0.05	0,145	0,098	0,072
CD3-/gIFN+ спонт., %	0,891	0,710	1,05	0,849	0,778	0,514	0,983	0,661	0,700	0,555
CD3-/gIFN+ спонт., 10 ⁹ /л	0,022	0,017	0,022	0,019	0,022	0,015	0,027	0,025	0,010	0,012
CD3-/gIFN+ стим., %	5,79	2,23	4,37	2,55	3,90	2,38	3,05 рк<0.05	2,46	4,53	2,45
CD3-/gIFN+ стим., 10 ⁹ /л	0,143	0,092	0,092	0,064	0,100	0,050	0,094	0,088	0,069	0,055

вания, отличаясь статистически значимо от контроля. Абсолютное содержание Т-лимфоцитов, синтезирующих IL2 и TNF α под действием дополнительной стимуляции, у больных БЭФ ЛБ было незначительно снижено на ранних сроках обследования, постепенно повышаясь на второй-третьей неделе заболевания (табл. 4). На 22-28 сутки количество Т-лимфоцитов, способных продуцировать IL2 и TNF α у больных БЭФ ЛБ было значительно ниже показателей в контрольной группе. Количество Т-лимфоцитов, продуцирующих IL4 (преимущественно Th2-лимфоциты) под

действием стимуляции, у пациентов с БЭФ ЛБ значимо повышалось по отношению к контролю на 15-21 сутки от начала заболевания.

Относительное и абсолютное содержание Т-лимфоцитов, способных синтезировать IFNg под действием неспецифической стимуляции, у больных БЭФ ЛБ в течение 1-7 суток от начала заболевания находилось на уровне контрольных значений. В последующие сроки наблюдения стимулированный синтез IFNg статистически значимо повышался, превышая на 15-21 сутки контрольные показатели (рис.2).

Относительное и абсолютное содержание

естественных киллеров у больных БЭФ ЛБ оставалось стабильным в течение всего периода обследования. Количество CD3-клеток, способных в ответ на стимуляцию синтезировать IFNg, снижалось по отношению к контрольному на 15-21 сутки от начала заболевания (рис. 2).

Обсуждение

Взаимоотношения в системе макроорганизм - *B. burgdorferi* определяются действием множества факторов, в т.ч. иммуномодулирующих компонентов слюны клеща, способности Bb проникать сквозь экстраклеточный матрикс, связывать и активировать протеолитические ферменты хозяина, органо-тропизма возбудителя, серореактивности макроорганизма, иммуногенетических факторов и профиля синтезируемых Т-лимфоцитами цитокинов, функционирования системы фагоцитоза и т.д.

Развивающаяся на ранних стадиях инфекционного процесса при БЭФ ЛБ умеренная лейкопения со снижением абсолютного содержания в периферической крови уровня гранулоцитов может быть обусловлена активной миграцией полиморфноядерных лейкоцитов (ПМЯЛ) под действием уникального хемотаксического фактора массой 13,900 kDa, выделяемого Bb [15]. В активации ПМЯЛ важную роль также играет тромбоцит-активирующий фактор (PAF) [16], инициирующий также синтез IL1 и TNFa. Под действием провоспалительных цитокинов, а также IL6, синтез которого индуцируется в макрофагах, глиальных клетках и т.д. под действием Bb [17] активируется миелопоэз, что обуславливает устойчивый моноцитоз и восстановление содержания периферических гранулоцитов на 8-14 сутки от начала заболевания. В основе стимулирующего влияния Bb на моноцитарное звено лежит и прямое активирующее действие бактериальных липопroteинов на TLR2 и CD14 рецепторы моноцитов, приводящее к up-регуляции провоспалительных реакций [18].

Фагоцитоз боррелий полиморфноядерными лейкоцитами был описан вскоре после того как был изолирован возбудитель [19]. Киллинг Bb в фагоцитах осуществляется с участием NO и кислородных радикалов [17]. Исследованиями K.Georgilis [15] было показано, что все штаммы Bb индуцируют респираторный взрыв в фагоцитах с образованием активных форм кислорода, однако ингибирование этих механизмов не приводит к значительному снижению киллинга. Блокирование продукции NO N-G-L-монометил аргинином не оказывает эффект на течение инфекции, тяжесть

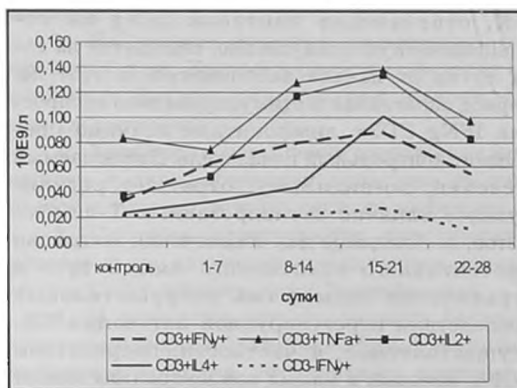


Рисунок 1. Спонтанный синтез цитокинов CD3+ и CD3- лимфоцитами больных БЭФ ЛБ

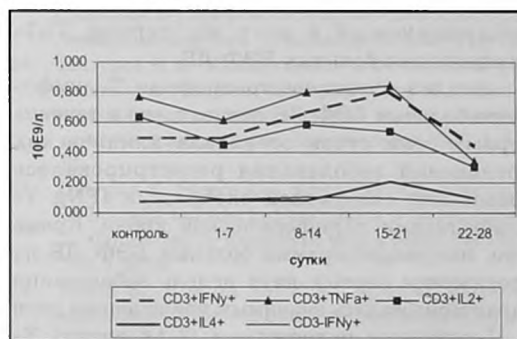


Рисунок 2. Стимулированный синтез цитокинов CD3+ и CD3- лимфоцитами больных БЭФ ЛБ

артритов и синтез антител, что говорит о в основном внеклеточной локализации Bb в ходе заболевания [20]. Изучение поглотительной и бактерицидной активности лейкоцитов периферической крови больных БЭФ ЛБ не выявило существенных изменений анализируемых показателей в динамике заболевания. Также не было зарегистрировано увеличения числа НСТ-положительных нейтрофилов, что свидетельствует о низкой спонтанной стимуляции кислород-зависимых механизмов киллинга.

Помимо IL1, IL6 и TNFa боррелии, активируя р40 промотор по TLR2-зависимому механизму [18], индуцируют синтез макрофагами интерлейкина 12 (IL12), потенциального активатора продукции IFNg NK-клетками и Т-лимфоцитами больных ЛБ. Изучение спонтанной и стимулированной экспрессии IFNg NK-клетками у пациентов с БЭФ ЛБ показало, что содержание спонтанно продуцирующих IFNg естественных киллеров статистически значимо не отличается от контроля на протяжении всего периода наблюдения, в то время как процент

NK, отвечающих синтезом IFNg на неспецифическую стимуляцию, снижается на 15-21 сутки от начала заболевания. В этот же период спонтанная и стимулированная экспрессия IFNg CD3+ лимфоцитами значимо превышает контрольный показатель. Наблюдаемый феномен, по-видимому, отражает регулирующее влияние активированных Т-лимфоцитов, необходимое для обеспечения экспансии протективного адаптивного иммунитета и ограничения возможных разрушительных последствий нерегулируемой активации NK, осуществляемое, в частности, посредством TGFb, который в малых концентрациях может селективно ингибировать NK-клеточную пролиферацию и продукцию IFNg [21]. Ингибирующее действие может оказывать на синтез IFNg NK-лимфоцитами и IL4, активно продуцируемый в этот же период Th2-лимфоцитами больных БЭФ ЛБ.

Анализ цитокинового профиля Т-лимфоцитов больных БЭФ ЛБ показал, что в течение первых семи суток от начала клинических проявлений заболевания регистрировалось повышение спонтанной экспрессии IFNg Т-лимфоцитами периферической крови. Кроме того, иммуноцитограмма больных БЭФ ЛБ на протяжении первых двух недель заболевания характеризовалась значимым увеличением доли и абсолютного содержания (8-14 сутки) Т-хелперных лимфоцитов, в то время как численность Т-цитотоксической субпопуляции существенно не изменялась. Активация CD3+CD4+-лимфоцитов (преимущественно Th1) по мнению ряда авторов является неадекватным способом реагирования на Bb инфекцию [1]. Последние исследования показывают, что наиболее выраженная воспалительная реакция у пациентов с ЛБ связана с развитием патологического иммунного ответа с преимущественной активацией Th1-лимфоцитов [22]. Повышенный уровень IL12, который оказывает позитивное влияние на дифференцировку Th1, выявлен в пораженных органах (исследование суставной жидкости). По мнению ряда исследователей IFNg-индуцированный синтез IgG2a-изотипа, фиксирующего комплемент и связывающегося с FcγRI на моноцитах с высокой аффинностью, приводит к комплемент- и моноцитопосредованным иммунопатологическим реакциям [23]. В то же время экспериментальные исследования показали, что Th1-или макрофаг-ассоциированные цитокины (TNFα и в меньшей степени IL2 и IFNg) могут ингибировать инфекцию Bb на ранних стадиях, хотя и не обладают прямым токсическим эффектом [24]. Кроме того, использование анти-IL12 приводило к снижению максимального

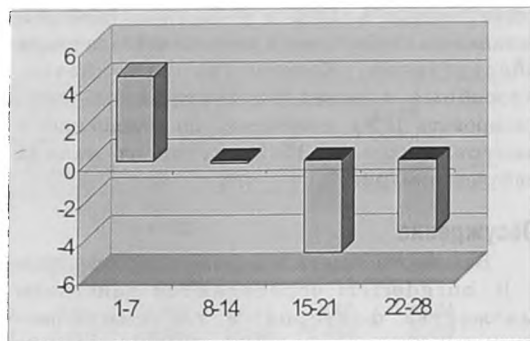


Рисунок 3. Соотношение IFNg- и IL4-синтезирующих Т-лимфоцитов в динамике острого периода БЭФ ЛБ ($k = \frac{CD3+IFNg+ст}{CD3+IL4+ст}$ проба - $\frac{CD3+IFNg+ст}{CD3+IL4+ст}$ контроль).

уровня антител и увеличению численности обнаруживаемых в биоптатах возбудителей [8].

Таким образом, синтезируемые на ранних стадиях инфекционного процесса провоспалительные (IL1, IL6, TNFα) и иммунорегуляторные (IL12 и IFNg) цитокины играют протективную роль, однако для эффективной элиминации возбудителя, особенно в случаях его активной дальнейшей диссеминации, необходимо участие гуморальных компонентов специфического иммунитета, регулируемых Т-лимфоцитами второго порядка.

Спонтанная и стимулированная экспрессия IL4 Т-лимфоцитами у обследованных нами больных БЭФ ЛБ значимо нарастала на 15-21 сутки от начала заболевания, приводя к смещению поляризации с первоначального Th1-профиля на Th2 (рис. 3). Со второй недели от начала заболевания наблюдалось увеличение общего содержания IgM и циркулирующих иммунных комплексов, по-видимому, обусловленное синтезом специфических антител, поскольку для БЭФ ЛБ характерны максимальные концентрации специфических IgM в течение второй-третьей недели болезни [25]. При этом повышении концентрации специфических IgG не было зарегистрировано вплоть до 45 суток от начала заболевания. Общий уровень IgG у больных БЭФ ЛБ также оставался сниженным на протяжении всего периода наблюдения. Помимо специфического антителобразования липидные последовательности OspA и B вызывают поликлональную В-клеточную активацию, приводя к пролиферации В-лимфоцитов и продукции IgM [17], что может являться причиной снижения содержания В-лимфоцитов в периферической циркуляции. Определенные

закономерности характеризовали экспрессию IL2 и TNF α Т-лимфоцитами больных БЭФ ЛБ. Несмотря на описанный ранее эффект снижения продукции IL2 мононуклеарами периферической крови под действием Bb [26], у наблюдаемых нами пациентов спонтанная экспрессия IL2 Т-лимфоцитами повышалась на второй-третьей неделе заболевания. Та же тенденция наблюдалась и в отношении TNF α , однако стимулированный синтез цитокинов значимо снижался к концу наблюдения, что, по-видимому, отражает общее снижение числа Т-лимфоцитов, синтезирующих цитокины Th1-профиля на фоне усиливающейся Th2-поляризации иммунного ответа.

Выводы

1. На ранних стадиях инфекционного процесса при Лайм-боррелиозе (безэритематозная форма) развивается умеренная гранулоцитопения.

2. Устойчивое повышение содержания моноцитов в периферическом кровотоке наблюдается в течение острого периода инфекции.

3. Система адаптивного иммунитета реагирует на инфекцию увеличением содержания CD4 $^{+}$ субпопуляции Т-лимфоцитов.

4. В динамике острого периода безэритематозной формы Лайм боррелиоза происходит смещение профиля цитокинового синтеза с первоначального Th1 на Th2.

Литература

1. Oschman P., Kraiczky P., Halperin J., Brade V. (Eds.) Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis. Auflagebremen: UNI-MED; 1999.
2. Singh S.K., Girschik H.J. Molecular survival strategies of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Lancet Infect Dis* 2004; 4: 575-83.
3. Steere A.C., Grodzicki R.L., Kornblatt A.N. et al. The spirochetal etiology of Lyme disease. *N Engl J Med* 1983; 308: 733-740.
4. Воробьева И.Н., Волегова Г.М., Бурылов А.Я. Клиника и течение безэритематозной формы иксодовых клещевых боррелиозов. *Мед паразит.* 1995;3:12-15.
5. Лесняк О.М. Лайм-боррелиоз. Екатеринбург; 1999.
6. Лобзин Ю.В., Усков А.Н., Козлов С.С. Лайм-боррелиоз (иксодовые клещевые боррелиозы). СПб: Фолиант; 2000.
7. Coyle P.K., Krupp L.B., Doscher C., Amin K. *Borrelia burgdorferi* reactivity in patients with severe persistent fatigue who are from a region in which Lyme disease is endemic. *Clin Infect Dis* 1994; 18: Suppl 1. 24-27.
8. Anguita J., Rincon M., Samanta S., Barthold SW., Flawell R.A., Firkig E. *Borrelia burgdorferi* infected, interleukin-6 deficient mice have decreased Th2 responses and increased Lyme arthritis. *J Infect Dis* 1998; 178: 1512-1515.
9. Keane-Myers A., Nickell P. Role of IL-4 and IFN- γ in modulation of immunity to *Borrelia burgdorferi* in mice. *J Immunol* 1995; 155:2020-28.
10. Matyniak J.E., Reiner S.L. T helper phenotype and genetic susceptibility in experimental Lyme disease. *J Exp Med* 1995; 181: 1251-4.
11. Ma Y., Seiler K.P., Tai K.F. et al. Outer surface lipoproteins of *Borrelia burgdorferi* stimulate nitric oxide production by the cytokine-inducible pathway. *Infect Immun* 1994; 62: Suppl 9. 3663-3671.
12. Yssel H., Nakamoto T., Schneider P. et al. Analysis of T lymphocytes cloned from the synovial fluid and blood of a patient with Lyme arthritis. *Int Immunol* 1990; 2: 1081-89.
13. Мазуров Д.В., Дамбаева С.В., Пинегин Б.В. Оценка внутриклеточного киллинга стафилококка фагоцитами периферической крови с помощью проточной цитометрии. *Иммунология* 2000; 2: 57-59.
14. Мазуров Д.В., Хамидуллина К.Ф., Пинегин Б.В. Оценка поглощения бактерий гранулоцитами и моноцитами периферической крови методом проточной цитометрии. *Иммунология* 2000; 1: 57-61.
15. Georgilis K., Steere A.C., Klempner M.S. Infectivity of *Borrelia burgdorferi* correlates with resistance to elimination by phagocytic cells. *J Infect Dis* 1991; 163: 150-55.
16. Isogai E., Kimura K., Fugii N. et al. Platelet-activating factor-mediated pathogenesis in Lyme disease. *Infect Immun* 1996; 64: 1026-29.
17. Sigal L.H. Lyme disease: a review of aspects of its immunology and immunopathogenesis. *Ann Rev Immunol* 1997; 15: 63-92.
18. Brightbill H.D., Modlin R.L. Toll-like receptors: molecular mechanism of the mammalian immune response. *Immunology* 2000; 101: 1-10.
19. Benach J., Fleit H.B., Habicht G.S. et al. Interactions of phagocytes with the Lyme disease spirochete: role of the Fc receptor. *J Infect Dis* 1984; 150: 497-507.
20. Seiler K., Vavrin Z., Eichwald E. et al. Nitric oxide production during murine Lyme disease: lack of involvement in host resistance or pathology. *Infect Immun* 1995; 63: 3886-95.
21. Biron C. Activation and function of natural killer cell responses during viral infections. *Curr Opin Immunol* 1997; 9: 24-34.
22. Oksi J., Savolainen J., Pene J. et al. Decreased interleukin-4 and increased gamma interferon production by peripheral blood mononuclear cells of patients with Lyme borreliosis. *Infect Immun* 1996; 64: 3620-3623.
23. Yang L., Ma Y., Schoenfeld R. Evidence for B-lymphocyte mitogen activity in *Borrelia burgdorferi*-infected mice. *Infect Immun* 1992; 60: 3033-3041.
24. Zeidner N., Dreitz M., Belasco D., Fish D. Suppression of acute *Ixodes scapularis*-induced *Borrelia burgdorferi* infection using tumor necrosis factor- α , interleukin-2, and interferon- γ . *J Infect*

- Dis 1996; 173: 187-95.
25. Корицова М.Ю. Специфический гуморальный иммунный ответ при различных вариантах острого периода Лайм-боррелиоза (дис... канд. мед. наук). Екатеринбург; 2002.
26. Chiao J., Pavia C., Riley M. et al. Antigens of Lyme disease spirochaete *Borrelia burgdorferi* inhibit antigen or mitogen-induced lymphocyte proliferation. FEMS Immunol Med Microbiol 1994; 8: 151-55.