

## Пролиферация и апоптоз лимфоцитов в ответ на стимуляцию боррелиозным антигеном у больных иксодовым клещевым боррелиозом

Ильинских Е.Н., Ильинских И.Н., Семёнов А.Г., Файт Е.А., Шайтарова М.В.

## Proliferation and apoptosis of lymphocytes in response to borrelia antigen stimulation in Lyme-borreliosis patients

Ilyinskikh Ye.N., Ilyinskikh I.N., Semyonov A.G., Fait Ye.A., Shaitarova M.V.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Ильинских Е.Н., Ильинских И.Н., Семёнов А.Г. и др.

Цель настоящей работы заключалась в определении взаимосвязи между особенностями пролиферации и апоптоза клеток в культурах лимфоцитов, стимулированных специфическим антигеном *B. garinii*, и развитием различных клинических исходов у больных иксодовым клещевым боррелиозом (ИКБ). Установлено, что стимуляция боррелиозным антигеном культур, полученных от больных хроническим ИКБ, приводит к развитию *in vitro* Т-хелперов типа 1 при одновременном подавлении апоптоза реактивных клеток, что может лежать в основе формирования персистентно активированного Т-клеточного иммунного ответа и хронического воспалительного процесса при этом заболевании.

**Ключевые слова:** иксодовый клещевой боррелиоз, проточная цитометрия, апоптоз, клеточный цикл, бромдезоксисуридин, реакция бластной трансформации лейкоцитов, *Borrelia garinii*, интерферон- $\gamma$ , интерлейкин-4.

The object of this work was to study the correlation between the lymphocyte proliferation and apoptosis in the cultures stimulated by specific inactivated *Borrelia garinii* antigen and the different clinical outcomes in Lyme borreliosis patients. It was found that borrelia antigen stimulation of the cultures obtained from chronic patients induced T helper type 1-like response as well as depression in lymphocyte apoptosis, which may provide the basis of persistent activated T cell immune response and chronic inflammatory in Lyme borreliosis.

**Key words:** Lyme borreliosis, flow-cytometry, apoptosis, cell cycle, bromodeoxyuridine, lymphocyte transformation test, *Borrelia garinii*, interferon- $\gamma$ , interleukin-4.

УДК 616.98:579.834.114]-097.1-008.853.2-091.818

### Введение

Иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ) — острое инфекционное трансмиссивное природно-очаговое заболевание, имеющее тенденцию к хроническому и рецидивирующему течению, поражающее различные органы и системы. Возбудители ИКБ — боррелии, относящиеся к комплексу *Borrelia burgdorferi sensu lato* (s.l.), объединяющему 12 геновидов этих спирохет [12], из которых на территории Западной Сибири наиболее распространены *B. garinii* и *B. afzelii* [3].

Известно, что в клиническом течении ИКБ выделяют острый, подострый и хронический периоды, которые соответствуют трем патогенетическим стадиям заболевания: локализованной (очаговой) инфекции,

характеризующейся появлением мигрирующей эритемы на месте присасывания клеща, стадии ранней диссеминированной инфекции, сопровождающейся появлением признаков поражения опорно-двигательного аппарата и внутренних органов, а также стадии персистентной поздней диссеминированной инфекции [4]. Как правило, если в острый и подострый периоды развития инфекционного процесса больной получает адекватную антибиотикотерапию, то происходит выздоровление. В других ситуациях заболевание часто переходит в резистентную к лечению современными методами персистентную инфекцию. Патогенетические механизмы хронизации ИКБ до сих пор остаются мало изученными.

Известно, что выраженный пролиферативный ответ Т-клеток на боррелии с доминированием ответа Т-хелперов типа 1 и гиперпродукцией интерферона- $\gamma$  (ИФ- $\gamma$ ) в острый период заболевания имеет важное значение для эрадикации возбудителя [11, 13]. Однако для благоприятного исхода заболевания необходимо ограничение воспалительного процесса, обусловленное переключением на преобладание гуморального иммунного ответа и снижением числа реактивных клеток [11].

Поэтому в исходе заболевания большое значение играют процессы, регулирующие пролиферацию Т-лимфоцитов. Апоптоз активированных лимфоцитов, наблюдаемый в фазы подъема и снижения иммунного ответа, называется активационно-индуцированной клеточной смертью [6]. Известно, что апоптоз Т-лимфоцитов является важным механизмом иммунорегуляции, необходимым для снижения числа реактивных клеток, а его подавление, как правило, наблюдается при хронических инфекциях и аутоиммунных заболеваниях [6]. Поэтому не исключено, что неадекватный воспалительный ответ при затяжном и хроническом течении ИКБ также может быть ассоциирован с нарушением апоптоза реактивных клеток.

Цель настоящей работы заключалась в определении взаимосвязи между особенностями пролиферации и апоптоза клеток в культурах лимфоцитов, стимулированных специфическим корпускулярным антигеном *B. garinii*, и развитием различных клинических исходов у больных ИКБ.

## Материал и методы

Обследовано 12 больных с диагнозом «серопозитивный вариант острого ИКБ», госпитализированных в клинику инфекционных болезней Сибирского государственного медицинского университета (г. Томск) на 2-й нед заболевания (группа IA), а также эти же пациенты в период реконвалесценции через 3 мес после эффективного курса антибиотикотерапии (группа IB). Выздоровление больных было подтверждено отсутствием клинической симптоматики и отрицательными результатами серологического обследования в течение одного года диспансерного наблюдения. Для исключения клещевого энцефалита и лабораторного подтверждения диагноза «ИКБ» использовался метод твердофазного иммуоферментного анализа (ИФА). Из анамнеза у этих групп пациентов было выяснено,

что никто из них ранее не болел ИКБ или другими клещевыми инфекциями и не подвергался укусам клещей в течение последних 5 лет. Кроме того, было обследовано 11 больных хроническим ИКБ в стадии субкомпенсации заболевания с преимущественным поражением опорно-двигательного аппарата (группа II).

Контрольная группа состояла из 14 здоровых лиц, не подвергавшихся ранее укусам клещей, не болевших иксодовым клещевым боррелиозом и не имевшим в крови специфических антител к антигенам боррелий (группа III).

При поступлении в стационар до назначения антибиотиков у всех обследованных лиц в пробирки с гепарином было взято 10 мл венозной крови. Мононуклеарные клетки были выделены с помощью центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-Paque (Pharmacia, Швеция). Клетки инкубировали во флаконах (около  $1 \cdot 10^6$  клеток в 1 мл) в среде RPMI-1640 («ПанЭко», г. Москва) с добавлением антибиотиков (100 мкг/мл стрептомицина и 100 МЕ/мл пенициллина) при температуре 37 °С и в присутствии 5% CO<sub>2</sub> в течение 120 ч для оценки реакции бластной трансформации лимфоцитов (РБТЛ), числа клеток в состоянии апоптоза и уровня пролиферативного ответа лимфоцитов или в течение 24 ч для определения концентрации цитокинов в супернатантах.

Для стимуляции мононуклеарных клеток использовали инактивированный корпускулярный антиген *B. garinii*, который был получен из коллекции штаммов боррелий отдела разработки и экспериментального производства препаратов НПО «Вирион» филиала ФГУП «НПО „Микроген“» МЗ РФ в г. Томске. Предварительное определение оптимальной концентрации корпускулярного антигена, необходимого для стимуляции пролиферативного ответа лимфоцитов *in vitro*, проводили в РБТЛ, смешивая клетки с инактивированными боррелиями в соотношениях 1:5, 1:10, 1:20 и 1:50 в соответствии с методикой, описанной в работе J. Sjöwall [5].

Для оценки РБТЛ в 5-дневных культурах, стимулированных или не стимулированных инактивированным боррелиозным антигеном, применялся морфологический метод с анализом не менее 500 клеток в препаратах, окрашенных красителем Романовского—Гимзы [2].

Для оценки числа клеток в состоянии апоптоза и уровня пролиферативного ответа лимфоцитов был

использован метод лазерной проточной цитометрии с детекцией иммунофлуоресцентно окрашенных клеток, инкорпорировавших бромдезоксисуридин (БДУ) с использованием набора FITC BrdU Flow Kit (BD Pharmingen, США) [9]. БДУ был добавлен в конечной концентрации 10 мкмоль/мл в 5-дневные культуры мононуклеарных клеток, стимулированных или не стимулированных боррелиозным антигеном, в срок за 24 ч до конца инкубации. Подготовка проб для анализа проводилась согласно инструкции производителя набора. Анализ числа (%) клеток, одновременно окрашенных 7-амино-актиномицином D (7-AAD) и анти-БДУ FITC-мечеными моноклональными антителами проводился с помощью проточного цитометра FACS Aria и программы FACSDiVA (Becton Dickinson).

Спонтанные и стимулированные антигенами уровни продукции интерлейкина-4 (ИЛ-4) и ИФ- $\gamma$  (пг/мл) в супернатантах 24-часовых культур мононуклеарных клеток периферической крови были определены с помощью твердофазного ИФА в соответствии с инструкциями, предлагаемыми производителем тест-систем (ООО «Протеиновый контур», г. Санкт-Петербург; BioSource, США). Оптическую плотность регистрировали с помощью иммунологического анализатора «Униплан» (ЗАО «Пикон», Россия) при длине волны 450 нм.

Для статистической обработки данных использовали стандартный пакет программ Statistica 7.0. Полученные результаты представлены как выборочное среднее арифметическое  $M$  и стандартное квадратичное отклонение  $\sigma$ . Для определения статистической значимости различий между независимыми группами (IA, IB или II группы от III контрольной группы; IA или IB группы от II группы) был использован непараметрический  $U$ -критерий Манна—Уитни. Для определения достоверности различий между зависимыми группами (между IA и IB группами; между спонтанными и стимулированными уровнями в каждой из групп) применялся критерий Вилкоксона [1]. Для выявления зависимостей между изучаемыми параметрами проводили ранговую корреляцию Спирмена. Критический уровень значимости  $p$  при проверке статистических гипотез в исследовании принимался равным 0,05.

## Результаты и обсуждение

В результате предварительного подбора концентрации корпускулярного антигена для стимуляции культур мононуклеарных клеток было установлено, что соотношение клеток и боррелий 1:20 является оптимальным для пролиферативного ответа лимфоцитов *in vitro*. При анализе результатов РБТЛ (рис. 1) было установлено, что 120-часовая стимуляция инактивированным корпускулярным антигеном боррелий культур, полученных от больных в острый и хронический периоды заболевания, а также от реконвалесцентов ((13,83 ± 5,26), (5,61 ± 3,97) и (19,45 ± 4,64)% для групп IA, IB и II соответственно) приводила к существенному росту трансформации лимфоцитов в бластные клетки по сравнению с соответствующими показателями в контроле ((0,31 ± 0,27)% для группы III,  $p < 0,01$ ). У больных острым и хроническим ИКБ, а также в группе реконвалесцентов стимуляция культур мононуклеарных клеток сопровождалась существенным повышением числа бласттрансформированных клеток по сравнению с соответствующими спонтанными значениями ((13,83 ± 5,26) против (0,60 ± 1,05)% для группы IA,  $p < 0,01$ ; (5,61 ± 3,97) против (0,43 ± 1,18)% для группы IB,  $p < 0,01$ ; (19,45 ± 4,64) против (1,65 ± 1,27)% для группы II,  $p < 0,01$ ).

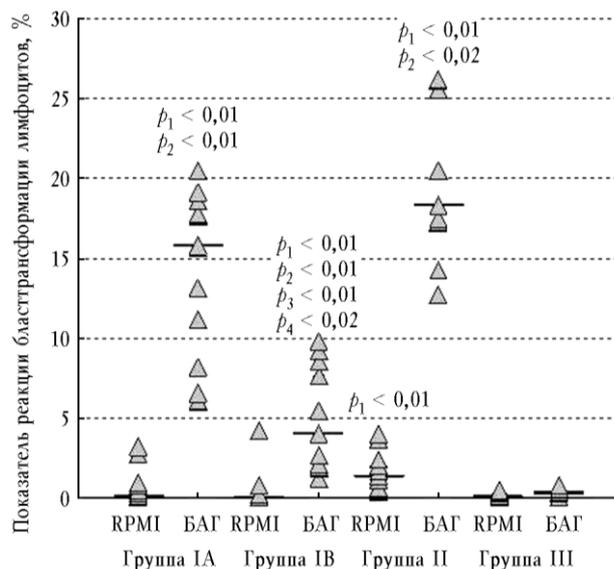


Рис. 1. Показатель реакции бластной трансформации лимфоцитов в не стимулированных (среда RPMI-1640) и в стимулированных инактивированным корпускулярным антигеном боррелий *B. garinii* (БАГ) с соотношением 1 : 20 клеток и бактерий в 120-часовых культурах периферической крови больных острым ИКБ (группа IA), здоровых реконвалесцентов ИКБ (группа IB), больных хроническим ИКБ (группа II) и контроля (группа III). Здесь и на рис. 2 для определения достоверности различий между независимыми группами

был использован критерий Манна—Уитни, а между зависимыми группами — критерий Вилкоксона:  $p$  — значимость различий между исследуемыми группами;  $p_1$  — отличие IA, IB или II групп от III группы (контроля);  $p_2$  — между спонтанным и стимулированным уровнями показателя в каждой группе;  $p_3$  — отличие IA или IB групп от II группы;  $p_4$  — различие между IA и IB группами. Горизонтальная

черта соответствует медиане

В контрольной группе лиц, не болевших ранее ИКБ (группа III), в отличие от больных людей показатели стимулированной трансформации лимфоцитов после добавления в культуры антигена были сопоставимы со спонтанными значениями ( $(0,31 \pm 0,27)$  против  $(0,20 \pm 0,17)\%$ ,  $p > 0,05$ ). У больных в период реконвалесценции острого ИКБ (группа IB) по сравнению с периодом разгара заболевания (группа IA) спонтанные уровни трансформации лимфоцитов достоверно не отличались между собой или от спонтанного уровня в контрольной группе III ( $(0,60 \pm 1,05)$  против  $(0,43 \pm 1,18)\%$ ,  $p > 0,05$ ). Вместе с тем после стимуляции антигеном культур лимфоцитов реконвалесценто́в ( $(5,61 \pm 3,97)\%$ , группа IB), пролиферативный ответ клеток был существенно ниже, чем в соответствующих культурах, полученных от больных с острым и особенно с хроническим течением заболевания ( $(13,83 \pm 5,26)\%$  для группы IA и  $(19,45 \pm 4,64)\%$  для группы II,  $p < 0,02$ ). Таким образом, наиболее высокие показатели спонтанной и стимулированной РБТЛ были характерны для больных с хроническим течением ИКБ. В отличие от больных острым ИКБ и реконвалесценто́в спонтанный уровень бластной трансформации лимфоцитов в культурах мононуклеарных клеток больных хроническим ИКБ был значительно выше соответствующих спонтанных значений в контроле ( $(1,65 \pm 1,27)$  против  $(0,20 \pm 0,17)\%$ ,  $p < 0,01$ ).

Активная пролиферация мононуклеарных клеток через 120 ч культивирования в ответ на антиген боррелий у больных острым и хроническим ИКБ по сравнению с контрольной группой была также выявлена при использовании метода проточной цитометрии иммунофлуоресцентно окрашенных клеток, инкорпорировавших БДУ (рис. 2). Поскольку аналог тимидина БДУ инкорпорируется в синтезируемую ДНК в течение фазы синтеза (S) клеточного цикла, то пул клеток, окрашенный анти-БДУ-антителами, соответствует этой фазе клеточного цикла. Одновременная окраска клеток на общее содержание ДНК с использованием 7-AAD позволяет с помощью двухцветной лазерной проточной

цитометрии определить число мононуклеарных клеток *in vitro*, инкорпорировавших БДУ и находящихся в состоянии апоптоза или в разных фазах клеточного цикла ( $G_0/G_1$ , S-фаза или  $G_2/M$ ). Поэтому клетки, находящиеся в фазах покоя  $G_0$  или  $G_1$ , можно рассматривать как не отвечающие на антигенный стимул, а клетки в фазах синтеза S,  $G_2$  и митоза M являются активно пролиферирующими.

В стимулированных культурах лимфоцитов (рис. 2, б, в), полученных от больных острым и хроническим ИКБ, было отмечено увеличение популяций клеток, находящихся в фазах  $G_2/M$  ( $(4,40 \pm 2,03)\%$  для группы IA и  $(6,16 \pm 2,74)\%$  для группы II) или в S-фаза ( $(18,11 \pm 4,50)\%$  для группы IA и  $(26,81 \pm 8,09)\%$  для группы II), по сравнению с соответствующими контрольными значениями ( $(1,04 \pm 0,70)$  и  $(2,51 \pm 2,03)\%$  для группы III,  $p < 0,02$ ). Одновременно в этих группах больных было установлено существенное уменьшение числа клеток в фазах  $G_0/G_1$  (рис. 2, а) по сравнению с контролем ( $(52,29 \pm 7,74)$  против  $(75,82 \pm 9,77)\%$  для группы IA,  $p < 0,02$ ;  $(56,61 \pm 9,91)\%$  против  $(75,82 \pm 9,77)\%$  для группы II,  $p < 0,02$ ).

Кроме того, в культурах больных хроническим боррелиозом, в которые не был добавлен антиген (спонтанный уровень), число клеток в S-фаза было достоверно выше ( $(4,72 \pm 2,53)\%$ ) по сравнению с соответствующими культурами реконвалесценто́в ( $(1,31 \pm 1,15)\%$ ,  $p < 0,02$ ) и контрольной группы ( $(1,60 \pm 1,33)\%$ ,  $p < 0,02$ ).

У больных хроническим ИКБ в нестимулированных культурах в отличие от других обследованных групп было также отмечено значительное увеличение по сравнению с контролем уровня клеток в фазах  $G_2/M$  ( $(1,92 \pm 1,10)$  против  $(0,51 \pm 0,58)\%$ ,  $p < 0,02$ ). У здоровых реконвалесценто́в стимуляция культуры антигеном приводила к увеличению числа пролиферирующих клеток, которые главным образом находились в фазе синтеза, но полученные значения были существенно ниже соответствующих стимулированных уровней у больных острым и особенно хроническим ИКБ ( $(7,86 \pm 3,46)$  против  $(18,11 \pm 4,50)\%$  для группы IA,  $p < 0,02$ ;  $(7,86 \pm 3,46)$  против  $(26,81 \pm 2,69)\%$  для группы II,  $p < 0,02$ ). Наиболее высокие уровни клеток в фазах S и  $G_2/M$  были характерны для больных с хроническим течением заболевания (рис. 2, б, в).

Полученные данные свидетельствуют о том, что мононуклеарные клетки больных хроническим ИКБ *in vivo* находятся в активированном состоянии. Об этом говорит существенное повышение числа клеток, находящихся в фазах S и G<sub>2</sub>/M клеточного цикла, в нестимулированных культурах. Не исключено, что этот «спонтанный» пролиферативный ответ лимфоцитов

обусловлен присутствием боррелий и их антигенов в плазме больных хроническим ИКБ.

Полученные результаты во многом совпадают с данными других исследователей, которые наблюдали существенно повышенный пролиферативный ответ лимфоцитов на стимуляцию антигенами *B. burgdorferi* в культурах, полученных от больных острой или хронической формами заболевания [8, 10].

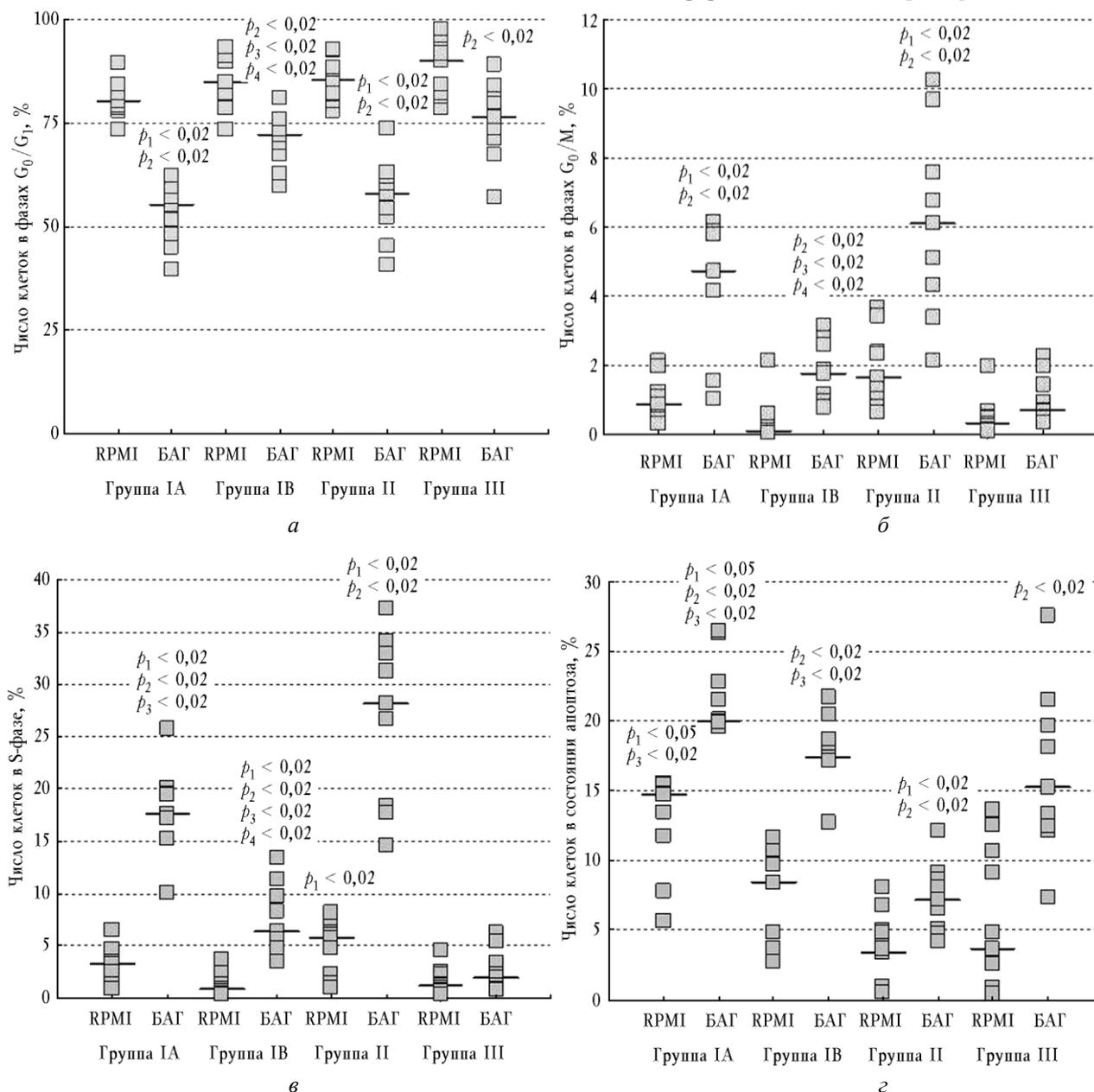


Рис. 2. Количественный анализ популяций лимфоцитов в различных фазах клеточного цикла или в состоянии апоптоза в не стимулированных (среда RPMI-1640) и стимулированных инактивированным корпускулярным антигеном боррелий *B. garinii* (БАГ) с соотношением 1 : 20 клеток и бактерий в 120-часовых культурах периферической крови больных острым ИКБ (группа IA), здоровых реконвалесцентов ИКБ (группа IB),

больных хроническим ИКБ (группа II) и контроля (группа III): *a* — число клеток в фазах G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>; *b* — число клеток в фазах G<sub>2</sub>/M; *c* — число клеток в фазе S; *z* — число клеток в состоянии апоптоза

Главной особенностью ответа лимфоцитов в культурах больных хроническим ИКБ (рис. 2,з) было значительное подавление стимулированного антигеном боррелий апоптоза лимфоцитов ((7,33 ± 2,51)%) как по сравнению с контролем ((16,40 ± 6,03)%, *p* < 0,02), так и по сравнению с соответствующими значениями этого показателя в группе больных острым ИКБ

((22,10 ± 2,86)%, *p* < 0,02) и у реконвалесцентов ((18,05 ± 2,64)%, *p* < 0,02).

Кроме изучения особенностей бластной трансформации лимфоцитов в стимулированных культурах больных ИКБ было проведено определение концентрации ИФ-γ и ИЛ-4 в супернатантах этих культур (таблица).

**Продукция цитокинов ИФ-γ и ИЛ-4 в не стимулированных или стимулированных инактивированным корпускулярным антигеном *B. garinii***

**24-часовых культурах лимфоцитов периферической крови больных ИКБ**

Группа	Уровень	ИФ-γ, пг/мл		<i>p</i>	ИЛ-4, пг/мл		<i>p</i>
		<i>M</i> ± <i>σ</i>	<i>Me</i> (min—max)		<i>M</i> ± <i>σ</i>	<i>Me</i> (min—max)	
IA	Спонтанный	39,9 ± 32,17	23 (18—105)	<i>p</i> <sub>1</sub> > 0,05 <i>p</i> <sub>3</sub> < 0,01	4,7 ± 4,64	4 (0—10)	<i>p</i> <sub>1</sub> > 0,05
	Стимулированный	268,27 ± 285,76	65 (30—730)	<i>p</i> <sub>1</sub> < 0,01 <i>p</i> <sub>2</sub> < 0,01 <i>p</i> <sub>3</sub> > 0,05	5,34 ± 4,65	3,5 (0—16)	<i>p</i> <sub>1</sub> > 0,05 <i>p</i> <sub>2</sub> > 0,05 <i>p</i> <sub>3</sub> < 0,01
IB	Спонтанный	21,09 ± 11,29	18 (15—43)	<i>p</i> <sub>3</sub> < 0,01	2,25 ± 2,86	1,5 (0—8)	<i>p</i> <sub>1</sub> > 0,05
	Стимулированный	37,45 ± 27,16	25 (20—109)	<i>p</i> <sub>2</sub> > 0,05 <i>p</i> <sub>3</sub> < 0,01 <i>p</i> <sub>4</sub> < 0,01	4,38 ± 3,30	3 (0—10)	<i>p</i> <sub>2</sub> > 0,05 <i>p</i> <sub>3</sub> < 0,01 <i>p</i> <sub>4</sub> > 0,05
II	Спонтанный	179,63 ± 158,88	115 (53—430)	<i>p</i> <sub>1</sub> < 0,01	3,09 ± 4,36	2 (0—12)	<i>p</i> <sub>1</sub> > 0,05
	Стимулированный	495,45 ± 319,0	500 (55—860)	<i>p</i> <sub>1</sub> < 0,01 <i>p</i> <sub>2</sub> < 0,02	0,60 ± 0,78	0 (0—2,0)	<i>p</i> <sub>1</sub> < 0,02 <i>p</i> <sub>2</sub> < 0,01
III	Спонтанный	28,27 ± 10,18	22 (20—45)	—	2,81 ± 2,22	2 (0—5,1)	—
	Стимулированный	32,36 ± 13,38	23 (18—51)	<i>p</i> <sub>2</sub> > 0,05	4,18 ± 4,42	2 (0—12,3)	<i>p</i> <sub>2</sub> > 0,05

Примечание. *p* — значимость различий между исследуемыми группами; *p*<sub>1</sub> — отличие IA, IB или II групп от III группы (контроля); *p*<sub>2</sub> — между спонтанным и стимулированным уровнями показателя в каждой группе; *p*<sub>3</sub> — отличие IA или IB групп от II группы; *p*<sub>4</sub> — различие между IA и IB группами.

В результате установлено, что стимулированная антигеном боррелий трансформация лимфоцитов у больных с острым и хроническим течением заболевания в отличие от контроля и реконвалесцентов сопровождалась значительным повышением содержания ИФ-γ в супернатантах по сравнению с соответствующими спонтанными значениями ((268,27 ± 285,76) против (39,9 ± 32,17) пг/мл, *p* < 0,01 в группе IA и (495,45 ± 319,0) против (179,63 ± 158,88) пг/мл, *p* < 0,02 в группе II). Уровни стимулированной продукции ИФ-γ в культурах больных острым и хроническим ИКБ ((268,27 ± 285,76) и (495,45 ± 319,00) пг/мл) были существенно выше соответствующих значений в группе реконвалесцентов (37,45 ± 27,16, *p* < 0,01) и в контроле (32,36 ± 13,38, *p* < 0,01). Кроме того, у больных острым и хроническим боррелиозом были выявлены значимые положительные корреляционные зависимо-

сти между значениями числа лимфоцитов, находящихся в фазах S и G<sub>2</sub>/M клеточного цикла, и концентрацией ИФ-γ в супернатантах соответствующих культур (*r* = +0,70 и +0,72 при *p* < 0,01 для группы IA и *r* = +0,83 и +0,77 при *p* < 0,01 для группы II).

С другой стороны, у больных острым ИКБ уровни спонтанной и стимулированной продукции ИЛ-4 в культурах не отличались от контроля (*p* > 0,05), а у больных с хронической формой заболевания концентрации стимулированной секреции этого цитокина были даже существенно ниже, чем в контрольной группе ((0,60 ± 0,78) против (4,18 ± 4,42) пг/мл, *p* < 0,02).

Поэтому было высказано предположение о том, что стимуляция антигеном боррелий культур, полученных от больных с острым и особенно с хроническим течением заболевания приводит к Т-хелпер типа 1-подобному ответу и сопровождается активной продукцией ИФ-γ.

В формировании хронического течения ИКБ большое значение придают наследственной или приобретенной дисрегуляции инициального врожденного иммунного ответа с последующим развитием нарушений приобретенного Т-клеточного ответа [13]. Полученные данные подтверждают предположение о том, что в культурах лимфоцитов больных хроническим ИКБ наблюдается повышенный пролиферативный ответ Т-лимфоцитов на антигены возбудителя при одновременном подавлении апоптоза реактивных клеток, что, по-видимому, отражает нарушение механизмов активационно-индуцированной клеточной смерти и может лежать в основе развития персистентно активированного Т-клеточного иммунного ответа и хронического воспалительного процесса при этом заболевании [6, 7, 11, 13].

## Выводы

1. В культурах лимфоцитов больных хроническим ИКБ наблюдается повышенный Т-хелпер типа 1-подобный ответ на антигены возбудителя при одновременном подавлении апоптоза реактивных клеток, что может лежать в основе формирования персистентно активированного Т-клеточного иммунного ответа и хронического воспалительного процесса при этом заболевании.

2. Стимуляция боррелиозным антигеном культур лимфоцитов, полученных от реконвалесцентов острого ИКБ, при благоприятном исходе заболевания приводила к росту числа клеток в состоянии апоптоза, что, по-видимому, отражает сохранение механизмов активационно-индуцированной клеточной смерти, способствующих снижению числа реактивных Т-лимфоцитов в период выздоровления при остром ИКБ.

## Литература

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1998. 459 с.
2. Новиков Д.К., Новикова В.И. Оценка иммунного статуса. М.: Витебск — Москва, 1996. 286 с.
3. Рябченко А.В. Получение рекомбинантных белков западносибирских изолятов *Borrelia burgdorferi sensu lato* и изучение их антигенных свойств: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Новосибирск, 2009. 21 с.
4. Asbrink E., Hovmark A. Comments on the course and classification of Lyme borreliosis // Scand. J. Infect. Dis. Suppl. 1991. V. 77. P. 41—43.
5. Sjöwall J., Carlsson A., Vaarala O. et al. Innate immune responses in Lyme borreliosis: enhanced tumour necrosis factor-alpha and interleukin-12 in asymptomatic individuals in

response to live spirochetes // Clin. Exp. Immunol. 2005. V. 141, № 1. P. 89—98.

6. *Budd R.C.* Activation-induced cell death // *Curr. Opin. Immunol.* 2001. V. 13, № 3. P. 356—362.
7. *Grygorczuk S., Osada J., Swierzbńska R. et al.* Expression of Fas receptor on human T lymphocytes under stimulation with *Borrelia burgdorferi sensu lato* — preliminary results // *Adv. Med. Sci.* 2010. V. 55, № 2. P. 228—234.
8. *Krause A., Brade V., Schoerner C. et al.* T cell proliferation induced by *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme borreliosis. Autologous serum required for optimum stimulation // *Arthritis Rheum.* 1991. V. 34, № 4. P. 393—402.
9. *Lacombe F., Beloc F., Bernard P., Boisseau M.R.* Evaluation of four methods of DNA distribution data analysis based on bromdeoxyuridine / DNA bivariate data // *Cytometry.* 1988. V. 9, № 3. P. 245—253.
10. *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. V. 64, № 9. P. 3620—3623.
11. *Pohl-Koppe A., Balashov K., Steere A.C. et al.* Identification of a T cell subset capable of both IFN- $\gamma$  and IL-10 secretion in patients with chronic *Borrelia burgdorferi* infection // *J. Immunol.* 1998. V. 160, № 4. P. 1804—1810.
12. *Postic D., Assous M.V., Grimont P.A. et al.* Diversity of *Borrelia burgdorferi sensu lato* evidenced by restriction fragment length polymorphism of rrf (5S)-rrl (23S) intergenic spacer amplicons // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1994. V. 44, № 4. P. 743—752.
13. *Widhe M., Jarefors S., Ekerfelt C. et al.* Borrelia-specific interferon- $\gamma$  and interleukin-4 secretion in cerebrospinal fluid and blood during Lyme borreliosis in humans: association with clinical outcome // *J. Infect. Dis.* 2004. V. 189, № 10. P. 1881—1891.

Поступила в редакцию 06.10.2011 г.

Утверждена к печати 05.03.2012 г.

#### Сведения об авторах

**И.Н. Ильинских** — д-р биол. наук, профессор кафедры микробиологии и вирусологии СибГМУ (г. Томск).

**Е.Н. Ильинских** — д-р мед. наук, профессор кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии СибГМУ (г. Томск).

**А.Г. Семёнов** — аспирант кафедры микробиологии и вирусологии СибГМУ (г. Томск).

**Е.А. Файт** — науч. сотрудник сектора гематологии, иммунологии и морфологии ЦНИЛ СибГМУ (г. Томск).

**М.В. Шайтарова** — ординатор кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии СибГМУ (г. Томск).

#### Для корреспонденции

**Ильинских Екатерина Николаевна**, тел.: 8-903-954-8817, 8 (382-2) 41-75-63; e-mail: infconf2009@mail.ru