

УДК 616.988-002.954-02:616.155.32
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2024-3-25-33>

Особенности субпопуляционного состава и функциональной активности лимфоцитов крови при клещевых инфекциях разной этиологии

Воронкова О.В., Ильинских Е.Н., Хасанова Р.Р., Есимова И.Е., Невская К.В., Карпова М.Р., Чернышов Н.А., Ямпольская А.В., Ямпольская О.В.

Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

РЕЗЮМЕ

Цель – провести сравнительную оценку субпопуляционного состава и функциональной активности лимфоцитов периферической крови у больных клещевым энцефалитом (КЭ) и иксодовым клещевым боррелиозом (ИКБ) в остром периоде заболевания.

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 22 больных с лихорадочной и менингеальной формами КЭ, 15 пациентов с безэритемной и эритемной формами ИКБ и 11 здоровых лиц. Определение субпопуляционного состава лимфоцитов в крови проводили методом проточной цитофлуориметрии. Пролиферативную активность лимфоцитов исследовали в реакции бластной трансформации. Цитокинпродуцирующую активность клеток исследовали в 24-часовых культурах мононуклеарных лейкоцитов; концентрацию цитокинов (интерлейкина (IL) 2, IL-4, IL-10, интерферона гамма (IFN γ)) определяли в культуральной жидкости методом иммуноферментного анализа.

Результаты. У пациентов с КЭ на фоне низкого по сравнению с контрольными значениями числа Т-лимфоцитов зарегистрировано повышение доли Т-хелперов/индукторов и выраженное снижение относительного и абсолютного количества Т-цитотоксических лимфоцитов. У больных ИКБ выявлено повышение числа Т-хелперов/индукторов и доли НК-клеток, а также сопоставимое с нормой количество Т-лимфоцитов и низкое содержание Т-цитотоксических клеток. Наиболее значимое снижение уровня ФГА-индуцированной лимфопротекции зарегистрировано у пациентов с КЭ. У пациентов обеих групп выявлено снижение секреции IL-2 в культуре мононуклеарных лейкоцитов, повышение наработки IL-4 и IL-10 и сопоставимый с нормой уровень продукции IFN γ .

Заключение. У больных КЭ на фоне относительной лимфоцитопении регистрируются изменения субпопуляционного состава лимфоцитов, характеризующиеся повышением доли Т-хелперов/индукторов при абсолютной недостаточности Т-цитотоксических лимфоцитов. При ИКБ наблюдается повышение доли НК-клеток, а дисбаланс соотношения Т-хелперы/Т-цитотоксические лимфоциты выражен сильнее, чем при КЭ. Изменения функционального фенотипа лимфоцитов вне зависимости от этиологического варианта инфекции характеризуются снижением резерва пролиферативной активности на фоне низкой секреции IL-2, повышением наработки IL-4 и IL-10 и недостаточной реактивностью лимфоцитов в отношении секреции IFN γ .

Ключевые слова: клещевой энцефалит, иксодовый клещевой боррелиоз, лимфоциты, цитокины

Конфликт интересов. Авторы гарантируют отсутствие потенциальных и явных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

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

Соответствие принципам этики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено этическим комитетом СибГМУ (протокол № 9119/1 от 30.05.2022).

✉ Воронкова Ольга Владимировна, voronkova-ov@yandex.ru

Для цитирования: Воронкова О.В., Ильинских Е.Н., Хасанова Р.Р., Есимова И.Е., Невская К.В., Карпова М.Р., Чернышов Н.А., Ямпольская А.В., Ямпольская О.В. Особенности субпопуляционного состава и функциональной активности лимфоцитов крови при клещевых инфекциях разной этиологии. *Бюллетень сибирской медицины*. 2024;23(3):25–33. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2024-3-25-33>.

Features of subset composition and functional activity of blood lymphocytes in tick-borne infections of different etiologies

Voronkova O.V., Ilyinskikh E.N., Hasanova R.R., Esimova I.E., Nevskaya K.V., Karpova M.R., Chernyshov N.A., Yampolskaya A.V., Yampolskaya O.V.

Siberian State Medical University

2, Moscow Trakt, 2, Tomsk, 634050, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. To perform a comparative assessment of subset composition and functional activity of peripheral blood lymphocytes in patients with tick-borne encephalitis (TBE) and ixodid tick-borne borreliosis (ITBB) in the acute phase of the disease.

Materials and methods. The study involved 22 patients with febrile and meningeal TBE, 15 patients with ITBB with and without erythema, and 11 healthy controls. Subset composition of blood lymphocytes was determined by flow cytometry. The blast transformation assay was applied to assess lymphocyte proliferation. Cytokine-producing activity of cells was studied in 24-hour incubated mononuclear cell cultures. Cytokine concentrations (interleukin (IL)-2, IL-4, IL-10, interferon (IFN) γ) were determined in the supernatants by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Results. Patients with TBE demonstrated an increase in the proportion of helper – inducer T-cells, a pronounced decrease in the proportion and absolute count of cytotoxic T cells, and low T lymphocyte count compared to the control values. The study in ITBB patients revealed an increase in the helper – inducer T-cell count and the proportion of NK-cells, a decrease in the cytotoxic T cell count, and the T lymphocyte count comparable to normal values. The most significant decrease in the levels of phytohemagglutinin-induced lymphocyte proliferation was found in patients with TBE. Patients of both groups showed a decrease in IL-2 secretion in the mononuclear cell culture, a rise in IL-4 and IL-10 production, and IFN γ production levels comparable to control values.

Conclusion. The study of TBE patients revealed relative lymphocytopenia with changes in the subset composition of lymphocytes characterized by an increase in the proportion of helper – inducer T-cells and a decrease in the absolute cytotoxic T lymphocyte count. Patients with ITBB demonstrated an increase in the proportion of NK-cells and a more pronounced imbalance in the T-helper / cytotoxic T lymphocyte ratio. Changes in the functional phenotype of lymphocytes, regardless of the etiology of tick-borne infection, were characterized by reduced proliferative reserve, low IL-2 secretion, increased IL-4 and IL-10 production, and depressed reactivity of lymphocytes with respect to IFN γ secretion.

Keywords: tick-borne encephalitis, ixodid tick-borne borreliosis, lymphocytes, cytokines

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious or potential conflict of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The study was supported by the Russian Science Foundation grant (No. 22-15-20010, <https://rscf.ru/project/22-15-20010/>) and the funds of the Tomsk Regional Administration.

Conformity with the principles of ethics. All patients signed an informed consent to participate in the study. The study was approved by the Ethics Committee at Siberian State Medical University (Protocol No. 9119/1 of 30.05.2022).

For citation: Voronkova O.V., Ilyinskikh E.N., Hasanova R.R., Esimova I.E., Nevskaya K.V., Karpova M.R., Chernyshov N.A., Yampolskaya A.V., Yampolskaya O.V. Features of subset composition and functional activity of blood lymphocytes in tick-borne infections of different etiologies. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2024;23(3):25–33. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2024-3-25-33>.

ВВЕДЕНИЕ

На фоне значительных успехов в области профилактики, диагностики и лечения большинства инфекционных заболеваний проблема клещевых природно-очаговых инфекций далека до своего полного решения. Частые случаи регистрации хронического течения иксодового клещевого боррелиоза (ИКБ), выраженный полиморфизм клинических проявлений и особенности течения клещевого энцефалита (КЭ) (от легких стертых форм до прогрессивных и тяжелых) с развитием отдаленных осложнений свидетельствуют о недостаточности научных знаний о проблеме взаимоотношений «патоген – макроорганизм» [1, 2].

Как известно, патогенез любого инфекционного заболевания представляет собой сложный динамический процесс, в ходе которого реализуется патогенный потенциал возбудителя во взаимодействии с факторами врожденного и адаптивного иммунитета организма хозяина. При этом функциональная состоятельность и эффективное кооперативное взаимодействие антигенпредставляющих, регуляторных и эффекторных иммунных клеток в процессе иммунного ответа в значительной степени определяют не только возможность манифестации, но и варианты исходов инфекционного процесса [3, 4]. В ряде случаев отсутствие специфических клинических и лабораторных проявлений при некоторых формах трансмиссивных природно-очаговых инфекций, передаваемых иксодовыми клещами, обуславливает трудности дифференциальной диагностики на ранних этапах развития заболевания [5]. В связи с этим изучение особенностей и механизмов развития разных этиологических вариантов клещевых инфекций имеет не только теоретическую, но и практическую значимость, в частности, для выявления новых биомаркеров нарушений структурного и функционального фенотипа иммунных клеток, значимых для диагностики и прогноза заболеваний.

Цель исследования – провести сравнительную оценку субпопуляционного состава и функциональной активности лимфоцитов периферической крови у больных клещевым энцефалитом и иксодовым клещевым боррелиозом в остром периоде заболевания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 37 пациентов с острыми клещевыми инфекциями, из них 22 больных с КЭ (лихорадочная и менингеальная формы, средний возраст пациентов $49,88 \pm 2,81$ лет) и 15 пациентов с ИКБ (эритемная и безэритемная формы, средний возраст $46,00 \pm 2,79$ лет). Диагноз устанавливали на основании собранного анамнеза и резуль-

татов объективного обследования, которое включало общеклинические лабораторные исследования и метод твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с определением в крови концентрации IgM и IgG к *Borrelia burgdorferi* s.l. и к вирусу КЭ, а также антигена вируса КЭ. Дополнительно у всех больных посредством ПЦР-диагностики (наборы серии «РеалБест», АО «Вектор-Бест», Россия) были исключены возвратная клещевая лихорадка, обусловленная инфицированием *Borrelia miyamotoi*, эрлихиоз и гранулоцитарный анаплазмоз человека. Контрольную группу составили 11 здоровых лиц (средний возраст $48,13 \pm 2,76$ лет). Материалом для исследования служила венозная кровь, взятая при поступлении пациента в стационар (инфекционная клиника ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России).

Определение абсолютных и относительных значений отдельных субпопуляций лимфоцитов (Т-лимфоцитов (CD3+CD19-), Т-хелперов/индукторов (CD3+CD4+CD45+), Т-цитотоксических лимфоцитов (CD3+CD8+CD45+), истинных «натуральных киллеров» (NK-клетки) (CD3-CD56+CD45+) и В-лимфоцитов (CD19+CD3-)) проводили методом иммунофенотипирования с использованием флуоресцентно-меченых моноклональных антител (Elabscience, КНР) и последующего многоцветного цитометрического анализа на проточном цитофлуориметре Accuri C6 (BD Biosciences, США). Для правильного исключения из зоны анализа всех частиц, не соответствующих по размерам и гранулярности живым лимфоцитам, вводили необходимые логические ограничения в гистограммы распределения по малому и боковому светорассеянию (рис.). Оценивали долю позитивных клеток от общего количества случаев в процентах, применяя логические ограничения по отдельным маркерам. В каждой пробе анализировали не менее 10^4 лимфоцитов. Абсолютное содержание субпопуляций клеток определяли, исходя из их доли и абсолютного содержания лимфоцитов в крови, которое определяли на гематологическом анализаторе Sysmex XN1000 (Sysmex, Япония).

Спонтанную и стимулированную пролиферативную активность клеток крови исследовали в реакции бластной трансформации лимфоцитов (РБТЛ). Культуральную суспензию готовили, смешивая в соотношении 1 : 4 гепаринизированную венозную кровь с питательной средой RPMI-1640, дополненной L-глутамином и эмбриональной телячьей сывороткой (ООО «БиолоТ», Россия). В одну из двух проб вносили фитогемагглютинин (ФГА) (Sigma, США) ($0,01 \text{ мг}/2,0 \times 10^6/\text{мл}$) и инкубировали при 37°C и 5%-й концентрации CO_2 в течение 72 ч. После

инкубации содержимое флаконов ресуспендировали, центрифугировали, из осадка готовили мазки, фиксировали и окрашивали азур П-эозином. Интенсивность РБТЛ определяли стандартным морфологическим методом в процессе световой микроскопии,

анализируя количество неизменных и бластных форм лимфоцитов (%), а также рассчитывали индекс стимуляции как отношение показателя ФГА-индуцированной бласттрансформации лимфоцитов к спонтанной.

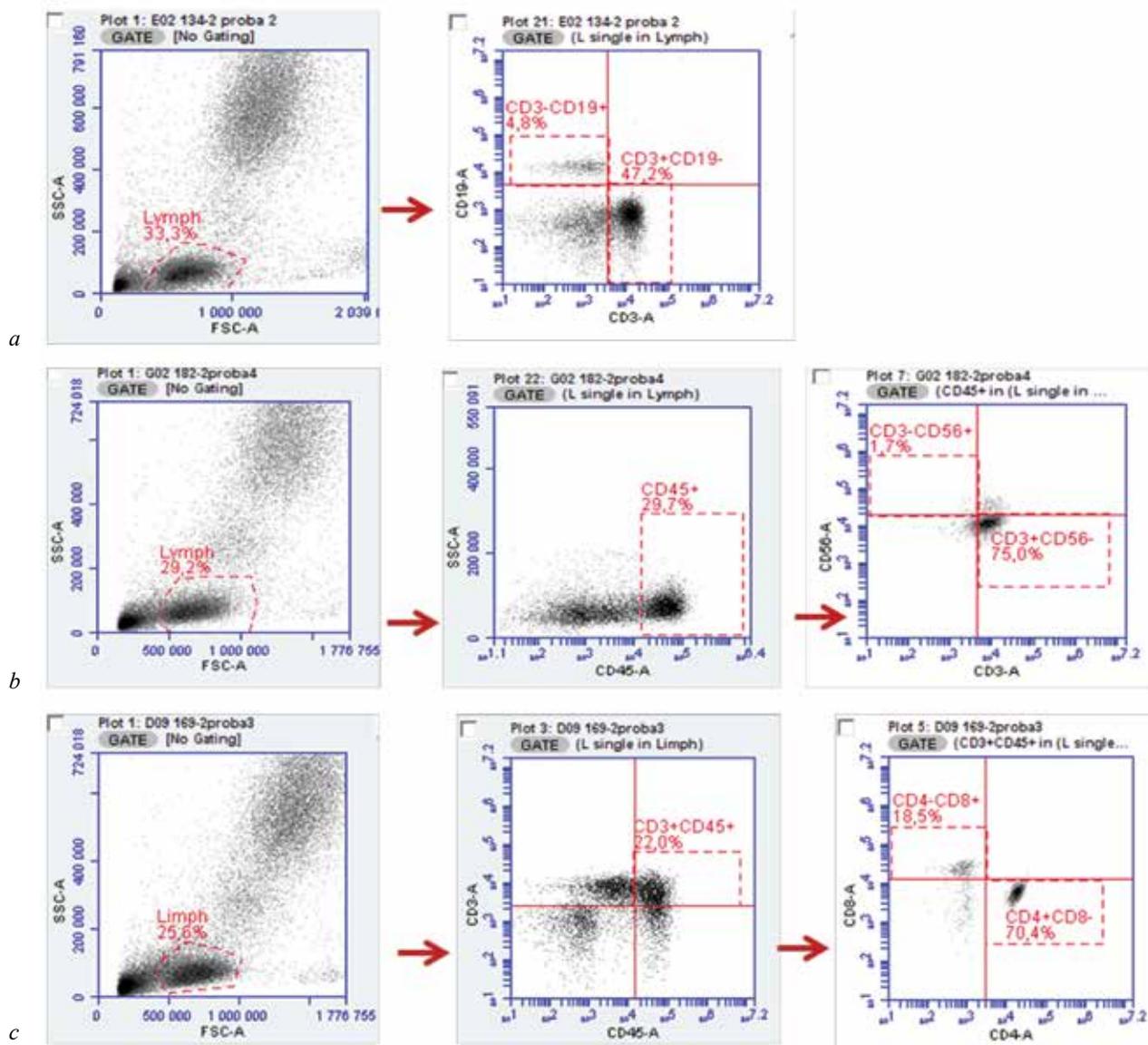


Рисунок. Распределение популяции лимфоцитов по субпопуляциям в зависимости от экспрессии поверхностных CD-маркеров: *a* – гистограмма распределения Т-лимфоцитов (CD3+) и В-лимфоцитов (CD19+); *b* – выделение гейта НК-клеток (CD3-CD56+) из общей популяции CD45-позитивных лимфоцитов; *c* – гистограмма распределения Т-хелперов/индукторов (CD4+) и Т-цитотоксических лимфоцитов (CD8+) после логического ограничения по CD45 и CD3

Цитокинпродуцирующую активность клеток исследовали в 24-часовых первичных культурах мононуклеарных лейкоцитов, выделенных из венозной крови методом градиентного центрифугирования на фиколле плотностью 1,077 г/см³ (ООО «Биолот», Россия). Культивирование клеток осуществляли в концентрации 2×10^6 /мл в полной питательной среде

без и с добавлением ФГА (50 мкг/мл). Концентрацию цитокинов (интерлейкинов (IL) 2, IL-4, IL-10, а также интерферона гамма (IFN γ)) определяли в культуральной жидкости методом ИФА с использованием наборов «Вектор-Бест» (Россия); рассчитывали индекс стимуляции как отношение показателя ФГА-индуцированной продукции цитокина к спонтанной.

Результаты обрабатывали в программе Statistica 12.0 (StatSoft, США). Данные, подчиняющиеся нормальному закону распределения (тест Шапиро – Уилка), представляли в виде среднего и стандартного отклонения ($M \pm SD$), не подчиняющиеся – медианы и межквартильного интервала $Me (Q_1; Q_3)$. Анализ различий между выборками выполняли при помощи t -критерия Стьюдента либо U -критерия Манна – Уитни с поправкой Бонферрони. При уровне значимости $p < 0,05$ различия двух сравниваемых величин считали статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При анализе показателей гемограммы в группе пациентов с КЭ на фоне повышения общего количества лейкоцитов в крови было зарегистрировано статистически значимое снижение доли лимфоцитов по сравнению с контрольными значениями (табл. 1). При этом абсолютное число лимфоцитов у больных КЭ было сопоставимо с нормой, равно как и у па-

циентов с ИКБ. По результатам иммунофенотипирования лимфоцитов крови у пациентов с КЭ на фоне низкого по сравнению с контрольными значениями числа Т-лимфоцитов было зарегистрировано повышение доли Т-хелперов/индукторов, а также выраженное снижение как относительного, так и абсолютного количества Т-цитотоксических лимфоцитов (в среднем в 1,8 и в 2 раза соответственно) (табл. 1).

У больных ИКБ количество Т-лимфоцитов было сопоставимо со значениями в контрольной группе, однако, как и у пациентов с КЭ, наблюдалось снижение числа Т-цитотоксических лимфоцитов, а повышение абсолютного числа численности Т-хелперов/индукторов носило абсолютный характер.

Количественные изменения данных субпопуляций лимфоцитов нашли отражение в индексах соотношения «Т-хелперы/Т-цитотоксические лимфоциты» – анализируемый показатель у больных оказался выше контрольных значений в среднем 2 раза (табл. 1).

Таблица 1

Общее количество лейкоцитов и субпопуляционный состав лимфоцитов в крови у больных клещевыми инфекциями, $Me (Q_1; Q_3)$								
Группа обследованных лиц	Общее количество лейкоцитов, $\times 10^9/\text{л}$	Доля лимфоцитов в гемограмме (в числителе в %, в знаменателе – $\times 10^9/\text{л}$)	Количественный состав отдельных субпопуляций лимфоцитов (в числителе в %, в знаменателе – $\times 10^9/\text{л}$)					Индекс соотношения (Т-хелперы / Т-цитотоксические)
			НК-клетки	Т-хелперы/индукторы	Т-цитотоксические лимфоциты	Т-лимфоциты	В-лимфоциты	
Контрольная группа, $n = 11$	5,76 (4,32; 5,90)	36,00 (32,00; 37,01) 2,08 (1,45; 2,18)	11,02 (8,98; 12,97) 0,21 (0,19; 0,26)	49,32 (47,30; 51,12) 1,01 (0,66; 1,08)	31,00 (29,9; 32,10) 0,62 (0,47; 0,70)	80,32 (78,2; 82,03) 1,70 (1,09; 1,71)	9,07 (8,97; 9,8) 0,16 (0,14; 0,19)	1,59 (1,54; 1,70)
Больные КЭ, $n = 22$	8,36 (5,82; 10,99) $p_1 = 0,01$	20,65 (13,2; 28,9) $p_1 = 0,04$ 1,43 (1,00; 2,38)	11,80 (8,01; 13,52) 0,21 (0,12; 0,28)	58,22 (53,12; 69,1) $p_1 = 0,04$ 0,76 (0,56; 1,10)	17,37 (11,48; 22,45) $p_1 = 0,01$ 0,29 (0,17; 0,41) $p_1 = 0,01$	73,76 (66,81; 86,12) $p_1 = 0,04$ 1,12 (0,77; 1,84) $p_1 = 0,04$	9,31 (4,52; 12,66) 0,17 (0,06; 0,29)	2,85 (2,10; 5,68) $p_1 = 0,03$
Больные ИКБ, $n = 15$	7,23 (5,49; 8,57) $p_1 = 0,03$	34,40 (19,85; 43,7) $p_2 = 0,04$ 2,09 (1,72; 2,79)	14,92 (11,13; 21,53) $p_1 = 0,04$ $p_2 = 0,04$ 0,26 (0,13; 0,46)	60,99 (52,93; 64,26) $p_1 = 0,04$ 1,19 (1,14; 1,72) $p_1 = 0,04$ $p_2 = 0,03$	16,81 (14,84; 18,29) $p_1 = 0,01$ 0,34 (0,27; 0,40) $p_1 = 0,01$	77,14 (71,22; 81,87) 1,54 (1,46; 2,08)	7,83 (4,92; 10,27) 0,16 (0,09; 0,27)	3,69 (3,40; 4,20) $p_1 < 0,001$

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3: p_1 – уровень значимости различий при сравнении с параметрами у здоровых лиц; p_2 – уровень значимости различий при сравнении с параметрами у пациентов с КЭ.

Следует отметить, что численность В-лимфоцитов в обеих группах обследованных пациентов была сопоставима с контрольными значениями. При этом у больных ИКБ было зарегистрировано статистически значимое повышение относительной численно-

сти НК-клеток по сравнению с соответствующими показателями у здоровых лиц.

В результате оценки пролиферативной активности лимфоцитов в культуре *in vitro* было установлено повышение по сравнению с параметрами

у здоровых лиц интенсивности спонтанной реакции бластной трансформации клеток только у пациентов с ИКБ (табл. 2).

Уровень ФГА-индуцированной лимфопротекции был значительно ниже контрольных значений у пациентов обеих групп, при этом наиболее значимое снижение данного показателя было зарегистрировано у пациентов с КЭ, что нашло отражение в изменении расчетных индексов ФГА-стимуляции (табл. 2).

Таблица 2

Результаты реакции бластной трансформации лимфоцитов крови у больных клещевыми инфекциями, $M \pm SD$			
Группа обследованных лиц	Реакция бластной трансформации лимфоцитов, %		Индекс стимуляции
	без добавления индуктора	в присутствии ФГА	
Контрольная группа, $n = 11$	$6,09 \pm 0,97$	$61,82 \pm 7,87$	$10,41 \pm 2,41$
Больные КЭ, $n = 22$	$7,55 \pm 3,31$	$26,78 \pm 11,52$ $p_1 < 0,001$	$3,79 \pm 1,19$ $p_1 < 0,001$
Больные ИКБ, $n = 15$	$10,40 \pm 2,48$ $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,003$	$49,63 \pm 7,12$ $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,002$	$4,98 \pm 1,18$ $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,03$

Наряду с пролиферативной активностью и экспрессионным профилем лимфоцитов периферической крови, одним из параметров, определяющих их функциональный фенотип, является способность к секреции иммунорегуляторных цитокинов. При выполнении настоящего исследования мы сосредоточили внимание на цитокинах (IL-2, -4, -10, IFN γ), оказывающих пара- и аутокринные эффекты на клетки за счет контроля всех стадий антигенспецифической пролиферации, дифференцировки и функциональной активности Т- и В-лимфоцитов [6–8]. При анализе цитокинпродуцирующей активности мононуклеарных лейкоцитов крови в культуре *in vitro*, у больных клещевыми инфекциями, независимо от их этиологического варианта, было выявлено снижение спонтанной и митоген-индуцированной наработки IL-2, наиболее выраженное у пациентов с ИКБ (табл. 3).

Интенсивность наработки IL-4 на базальном уровне у всех пациентов оказалась выше таковой у здоровых лиц, равно как и уровень спонтанной и ФГА-индуцированной секреции IL-10. Повышение продукции IL-4 в пробах с добавлением ФГА (в среднем в 2 раза по сравнению с контрольными значениями) было зарегистрировано у больных ИКБ (табл. 3).

Таблица 3

Концентрация цитокинов в культуральной среде 24-часовых культур мононуклеарных лейкоцитов крови у больных клещевыми инфекциями, $Me (Q_1; Q_3)$

Анализируемый показатель		Контрольная группа, $n = 11$	Больные КЭ, $n = 22$	Больные ИКБ, $n = 15$
Концентрация IL-2, пг/мл	без индуктора	44,52 (32,74; 112,13)	32,11 (11,56; 48,06) $p_1 = 0,01$	10,78 (9,78; 13,19) $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,03$
	в присутствии ФГА	93,50 (66,96; 275,88)	27,21 (24,28; 68,74) $p_1 = 0,005$	24,27 (21,01; 27,57) $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,03$
	индекс стимуляции	2,85 (1,57; 5,52)	2,20 (1,64; 2,60) $p_1 = 0,04$	2,11 (1,68; 2,62) $p_1 = 0,04$
Концентрация IL-4, пг/мл	без индуктора	2,92 (2,51; 4,93)	10,51 (6,50; 23,88) $p_1 = 0,01$	26,18 (22,13; 30,35) $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$
	в присутствии ФГА	19,72 (10,20; 22,32)	19,90 (10,38; 46,97)	44,43 (41,42; 66,06) $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,01$
	индекс стимуляции	4,00 (3,49; 8,83)	2,11 (1,89; 2,19) $p_1 < 0,001$	1,99 (1,41; 2,48) $p_1 = 0,001$
Концентрация IL-10, пг/мл	без индуктора	9,36 (2,45; 12,65)	37,28 (12,89; 53,71) $p_1 = 0,02$	28,77 (20,01; 90,87) $p_1 = 0,001$
	в присутствии ФГА	27,39 (12,87; 59,75)	88,66 (57,09; 141,46) $p_1 = 0,04$	112,39 (48,07; 129,70) $p_1 = 0,004$
	индекс стимуляции	4,72 (1,38; 11,09)	2,22 (2,13; 2,73) $p_1 = 0,02$	2,20 (1,02; 5,20) $p_1 = 0,01$
Концентрация IFN γ , пг/мл	без индуктора	26,96 (9,47; 43,61)	21,27 (14,82; 25,01)	16,50 (8,81; 41,81)
	в присутствии ФГА	25,59 (22,45; 49,30)	24,39 (11,49; 41,25)	21,77 (19,11; 44,34)
	индекс стимуляции	0,98 (0,51; 4,85)	1,02 (0,50; 2,79)	1,81 (0,43; 3,95)

Следует отметить, что концентрация $IFN\gamma$ в первичных культурах мононуклеарных лейкоцитов крови у больных клещевыми инфекциями не отличалась от таковой у здоровых доноров, как в образцах без индукции, так и в пробах с добавлением митогена (табл. 3). В результате анализа изменений расчетных индексов стимуляции было установлено их статистически значимое снижение относительно контрольных показателей у пациентов обеих групп для $IL-2$, $IL-4$ и $IL-10$, что свидетельствует о снижении резерва секреторной активности мононуклеарных лейкоцитов в отношении данных цитокинов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что содержание в периферической крови различных субпопуляций лимфоцитов в остром периоде инфекционного заболевания является результатом их динамического перераспределения в ходе активной миграции наивных лимфоцитов в периферические лимфоидные органы, где они взаимодействуют с антигенпредставляющими клетками, последующей пролиферации и выхода коммитированных клонов в кровь, миграции в ткани, возвращения в периферические лимфатические органы и апоптоза [9, 10]. Количественные и качественные характеристики инфекционнообусловленного иммунного ответа зависят от многих факторов, в том числе от типа антигена, его дозы и пути поступления в организм.

По данным ряда исследований, изменения популяционного и субпопуляционного спектра лимфоцитов, характеризующиеся снижением числа клеток, несущих маркеры Т-звена ($CD3+$, $CD4+$, $CD8+$), и повышением числа В-лимфоцитов, являются типичными для острого периода КЭ [11–13]. На фоне относительной лимфоцитопении у больных с лихорадочной и менингеальной формами КЭ мы зарегистрировали количественный дефицит популяции Т-лимфоцитов (за счет $CD8+$ -лимфоцитов), тогда как численность В-клеток, равно как и количество натуральных киллеров, были сопоставимы с контрольными значениями. При этом нами был выявлен значительный дисбаланс в соотношении хелперных и цитотоксических субпопуляций лимфоцитов, а также выраженное снижение пролиферативной активности клеток в ответ на ФГА (см. табл. 2).

Вероятно, снижение численности $CD8+$ -субпопуляции при КЭ является следствием недостаточного пролиферативного ответа клеток на вирусные антигены. Следует предположить также прямое цитотоксическое воздействие вируса КЭ и избирательное поражение Т-системы иммунитета, обусловленное его размножением в тимусе, контролирующем процессы

созревания, дифференцировки и функциональной активности Т-клеток.

Так, некоторые исследователи указывают на развитие «клонального истощения» коммитированных Т-лимфоцитов в условиях вирусной персистенции со смещением иммунного баланса в сторону Th2 [14, 15]. Это согласуется с полученными нами результатами по оценке цитокинпродуцирующей активности мононуклеарных клеток в остром периоде КЭ, а именно выявленным высоким уровнем наработки $IL-10$ и $IL-4$ в культуре при снижении секреции $IL-2$, а также недостаточной реактивностью лейкоцитов в отношении синтеза $IFN\gamma$ (см. табл. 3). В условиях низкой наработки $IL-2$ лимфоциты не обладают достаточным резервом к усилению пролиферации в ответ на стимуляцию ФГА, который, вероятно, не компенсируется эффектами ряда других провоспалительных цитокинов, например $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-12$ и др.

Натуральные киллерные клетки, являясь одними из компонентов врожденной иммунорезистентности, не обладают функцией специфического распознавания, как это имеет место в случае Т-цитотоксических клеток, а также в механизмах антителозависимой клеточной цитотоксичности [16]. Наряду с доминирующей ролью НК-клеток в иммунопатогенезе заболеваний вирусной этиологии, важной представляется их цитолитическая функция и в генезе бактериальных инфекций. При бактериальных инфекциях НК-клетки могут активироваться как за счет перекрестного взаимодействия с другими лейкоцитами, так и посредством прямого распознавания патоген-ассоциированных молекулярных паттернов [17].

На сегодняшний день имеются доказательства того, что НК-клетки экспрессируют паттерн-распознающие молекулы, такие как Toll- и NOD-подобные рецепторы [17, 18]. Весьма важным обстоятельством представляется обнаруженная способность боррелий индуцировать увеличение количества НК-клеток в начале заболевания [19, 20]. При этом цитолитическая активность натуральных киллеров не может служить эффективным механизмом элиминации внеклеточных патогенов, к которым относятся боррелии. Однако в условиях дефицита цитотоксических лимфоцитов и неэффективности антителогенеза, основную функцию по лимитированию инфекции, вероятно, берут на себя НК-клетки, подтверждением чему служит выявленное нами повышение их численности у больных ИКБ. При этом роль НК-клеток и Th1-лимфоцитов в иммунопатогенезе боррелиозной инфекции в большей степени определяется их способностью оказывать стимулирующее действие на фагоцитоз посредством синтеза цитокинов ($IFN\gamma$, $IL-12$), активирующих макрофаги [21, 22].

Несмотря на то, что у обследованных нами пациентов с ИКБ мы зарегистрировали повышение абсолютного числа Т-хелперной субпопуляции лимфоцитов, уровни базальной и ФГА-стимулированной секреции IFN γ в культуре мононуклеарных лейкоцитов не отличались от контрольных значений. При этом у больных ИКБ, так же, как и у пациентов с КЭ, был зарегистрирован низкий уровень продукции IL-2 при повышении секреции IL-4 и IL-10. Выявленные изменения цитокинсекреторного профиля мононуклеарных лейкоцитов у больных ИКБ представляются нам вполне закономерными и являются отражением эффекторной фазы иммунного ответа на боррелиозные антигены. Именно так реализуется кооперативное взаимодействие макрофагов и лимфоцитов, опосредованное цитокинами, которое обеспечивает накопление коммитированных Т-лимфоцитов-хелперов 2-го типа, обеспечивающих образование в лимфоидных органах необходимого пула плазматических клеток, синтезирующих антитела к антигенам боррелий.

В целом при анализе полученных результатов и сопоставлении их с данными литературы в опубликованных работах мы отметили значительную вариабельность изменений показателей иммунного статуса при клещевых инфекциях, как в части количественных изменений анализируемых параметров, так и их трактовки с позиции сложных механизмов иммунорегуляции [4, 11–13, 22]. При этом многие авторы отмечают корреляцию глубины депрессии либо степени активации отдельных звеньев врожденного и адаптивного иммунитета с тяжестью клинического течения заболевания, что, на наш взгляд, определяет актуальность продолжения исследований механизмов иммунологической реактивности организма при разных клинических формах клещевых инфекций, в том числе в динамике развития инфекционного процесса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования установлено, что у больных КЭ на фоне относительной лимфоцитопении регистрируются изменения субпопуляционного состава лимфоцитов в крови, характеризующиеся повышением доли Т-хелперов/индукторов при абсолютной недостаточности Т-цитотоксических лимфоцитов. У пациентов с ИКБ дисбаланс соотношения Т-хелперы/Т-цитотоксические лимфоциты выражен сильнее, чем при КЭ, при этом наблюдается повышение относительного числа НК-клеток. Изменения функционального фенотипа лимфоцитов у больных с КЭ и ИКБ характеризуются равно выраженным снижением резерва пролиферативной активности на фоне низкой секреции IL-2, повышением наработки IL-4 и

IL-10 и недостаточной реактивностью лимфоцитов в отношении секреции IFN γ .

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Проворова В.В., Краснова Е.И., Хохлова Н.И., Савельева М.А., Филимонова Е.С., Кузнецова В.Г. 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. Андаев Е.И., Никитин А.Я., Толмачёва М.И., Зарва И.Д., Яценко Е.В., Матвеева В.А. и др. Эпидемиологическая ситуация по клещевому вирусному энцефалиту в Российской Федерации в 2022 г. и прогноз ее развития на 2023 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023;(1):6–16. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-1-6-16.
3. Пинегин Б.В., Хаитов Р.М. Современные принципы создания иммуотропных лекарственных препаратов. *Иммунология*. 2019;40(6):57–62. DOI: 10.24411/0206-4952-2019-16008.
4. Андронова Н.В., Миноранская Н.С., Миноранская Е.И. Специфический иммунный ответ и некоторые отдаленные результаты при остром течении иксодового клещевого боррелиоза и микст-инфекции клещевого энцефалита и иксодового клещевого боррелиоза. *Сибирский медицинский журнал (Иркутск)*. 2011;100(1):54–57.
5. Филимонова Е.С., Бондаренко Е.И., Краснова Е.И., Проворова В.В., Криницына Э.В., Олейник А.Н. и др. Выявление маркеров возбудителей природно-очаговых инфекций, передающихся клещами. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2021;10(4):90–97. DOI: 10.33029/2305-3496-2021-10-4-90-97.
6. Симбирцев А.С. Иммунофармакологические аспекты системы цитокинов. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019;18(1):84–95. DOI: 10.20538/1682-0363-2019-1-84-95.
7. Ng C.T., Oldstone M.B. IL-10: achieving balance during persistent viral infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2014;380:129–144. DOI: 10.1007/978-3-662-43492-5_6.
8. Welsh R., Bahl K., Marshall H., Urban S. Type 1 interferons and antiviral CD8 T-cell responses. *PLoS Pathog.* 2012;8(1):e1002352. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002352.2012. V.8:e1002352.
9. Marelli-Berg F.M., Fu H., Vianello F., Tokoyoda K., Hamann A. Memory T-cell trafficking: new directions for busy commuters. *Immunology*. 2010;130(2):158–165. DOI:10.1111/j.1365-2567.2010.03278.x.
10. Литвинова Л.С., Гуцол А.А., Сохоневич Н.А., Кофанова К.А., Хазиахматова О.Г., Шуплецова В.В. и др. Основные поверхностные маркеры функциональной активности Т-лимфоцитов (обзор). *Медицинская иммунология*. 2014;16(1):7–26. DOI: 10.15789/1563-0625-2014-1-7-26.
11. Крылова Н.В., Леонова Г.Н., Павленко Е.В., Запорожец Т.С., Смолина Т.П., Гажа А.К. и др. Комплексная оценка состояния иммунной системы при различных формах клещевого энцефалита в остром периоде. *Медицинская иммунология*. 2012;14(4-5):313–320.
12. Крылова Н.В., Леонова Г.Н. Некоторые особенности иммунопатогенеза клещевого энцефалита. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2007;3(29):21–24.

13. Blom K., Cuapio A., Sandberg J.T., Varnaite R., Michaëls-son J., Björkström N.K. et al. Cell-mediated immune responses and immunopathogenesis of human tick-borne encephalitis virus-infection. *Front. Immunol.* 2018;9:2174. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02174.
14. Stone E.T., Pinto A.K. T Cells in tick-borne flavivirus encephalitis: a review of current paradigms in protection and disease pathology. *Viruses.* 2023;15(4):958. DOI: 10.3390/v15040958.
15. Насырова Р.Ф., Рязанцева Н.В., Жукова Н.Г., Зима А.П., Жукова О.Б., Чечина О.Е. и др. Молекулярные и клеточные основы патогенеза клещевого энцефалита. *Бюллетень сибирской медицины.* 2006;(1):42–51.
16. Абакушина Е.В., Кузьмина Е.Г., Коваленко Е.И. Основные свойства и функции НК-клеток человека. *Иммунология.* 2012;33(4):220–224.
17. Athié-Morales V., O'Connor G.M., Gardiner C.M. Activation of human NK cells by the bacterial pathogen-associated molecular pattern muramyl dipeptide. *J. Immunol.* 2008;180(6):4082–4089. DOI: 10.4049/jimmunol.180.6.4082.
18. Freud A.G., Mundy-Bosse B.L., Yu J., Caligiuri M.A. The broad spectrum of human natural killer cell diversity. *Immunology.* 2017;47(5):820–833. DOI: 10.1016/j.immuni.2017.10.008.
19. Oosting M., Brouwer M., Vrijmoeth H.D., Pascual Domingo R., Greco A., Ter Hofstede H. et al. *Borrelia burgdorferi* is strong inducer of IFN- γ production by human primary NK cells. *Cytokine.* 2022;155:155895. DOI: 10.1016/j.cyto.2022.155895.
20. Scorza B.M., Mahachi K.G., Cox A.D., Toepp A., Pessoa-Pereira D., Tyrrell P. et al. Role of NK-like CD8+ T cells during asymptomatic *Borrelia burgdorferi* infection. *Infect. Immun.* 2022;90(5):e0055521. DOI: 10.1128/iai.00555-21.
21. 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.
22. Tomasiewicz K., Chmielewska-Badora J., Zwolinski J., Murias-Brylowska E. Analysis of main T-cell subsets and activated T suppressor/cytotoxic cells in patients with *Borrelia burgdorferi* s. lato only infection and co-infections with *Anaplasma phagocytophilum*, *Bartonella* spp. and *Babesia microti*. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2016;23(1):111–115. DOI: 10.5604/12321966.1196864.

Вклад авторов

Воронкова О.В., Ильинских Е.Н. – разработка концепции и дизайна исследования, написание рукописи. Хасанова Р.Р., Есимова И.Е., Невская К.В., Карпова М.Р. – анализ и интерпретация данных. Чернышов Н.А., Ямпольская А.В., Ямпольская О.В. – выполнение лабораторных методов исследования.

Информация об авторах

Воронкова Ольга Владимировна – д-р мед. наук, доцент, зав. кафедрой биологии и генетики, СибГМУ, г. Томск, voronkova-ov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9478-3429>

Ильинских Екатерина Николаевна – д-р мед. наук, доцент, профессор кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии, СибГМУ, г. Томск, infconf2009@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7646-6905>

Хасанова Резеда Рахматулловна – канд. мед. наук, доцент кафедры биологии и генетики, СибГМУ, г. Томск, hasanova_rezeda@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3250-7688>

Есимова Ирина Евгеньевна – д-р мед. наук, доцент кафедры биологии и генетики, СибГМУ, г. Томск, orevi@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7508-2878>

Невская Ксения Владимировна – канд. мед. наук, науч. сотрудник, центр биологических исследований и биоинженерии, СибГМУ, г. Томск, nevskaya.kv@ssmu.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1659-8812>

Карпова Мария Ростиславовна – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой микробиологии и вирусологии, СибГМУ, г. Томск, mrkarпова@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7109-9955>

Чернышов Никита Алексеевич – аспирант, СибГМУ, nchernyschov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4008-5606>

Ямпольская Олеся Владимировна – студент, СибГМУ, г. Томск, lesyapolskaya.01@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3362-8307>

Ямпольская Анастасия Владимировна – студент, СибГМУ, г. Томск, nastya.yampolskaya13@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0002-2003-7225>

✉ **Воронкова Ольга Владимировна**, voronkova-ov@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.01.2024;
одобрена после рецензирования 13.03.2024;
принята к публикации 25.04.2024