

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
СИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

Мельникова Анастасия Павловна

ФУНКЦИОНАЛЬНО-МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ СТАТУС ФАГОЦИТИРУЮЩИХ
КЛЕТОК КРОВИ У БОЛЬНЫХ КЛЕЩЕВЫМ ЭНЦЕФАЛИТОМ И
ИНФЕКЦИЕЙ-МИКСТ

14.00.16 – патологическая физиология

03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научные руководители: заслуженный деятель науки России,

член-корреспондент РАМН,

профессор, В.В. Новицкий

кандидат медицинских наук

Н.П. Пирогова

ТОМСК-2003

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	8
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Роль и место фагоцитов периферической крови в инфекционной патологии вирусного происхождения.....	14
1.2. Система мононуклеарных фагоцитов в патогенезе флавивирусных заболеваний.....	16
1.2.1. Роль мембранных рецепторов моноцитов/макрофагов в механизмах осуществления их специализированных функций.....	16
1.2.2. Секреторная активность и вируснейтрализующий потенциал моноцитов/макрофагов	20
1.2.2.1. Секреторная функция мононуклеарных фагоцитов.....	20
1.2.2.2. Роль цитокинов в выполнении моноцитами/макрофагами фагоцитарной функции при вирусных инфекциях	21
1.2.2.3. Роль оксида азота при флавивирусных инфекциях.....	28
1.3. Нейтрофильные гранулоциты периферической крови в патогенезе инфекционных заболеваний	30
1.3.1. Рецепторный аппарат полиморфноядерных лейкоцитов.....	30
1.3.2. Механизмы хемотаксиса и адгезии лейкоцитов к очагу повреждения ..	33
1.3.3. Бактерицидные системы нейтрофилов	34
1.3.4. Роль цитокинов в регуляции фагоцитарной активности нейтрофилов при действии инфекционных агентов.....	39
1.3.5. Нейтрофилокины в механизмах неспецифической резистентности	41
1.4. Краткая характеристика клещевого энцефалита.....	45
1.4.1. Эпидемиология и этиология клещевых нейроинфекций.....	45
1.4.2. Патогенез клещевого энцефалита	49
Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	53
2.1. Материал исследования.....	53
2.1.1. Общая характеристика больных.....	53

2.1.2. Краткая клиническая характеристика больных клещевым энцефалитом и инфекцией-микст	54
2.2. Методы исследования.....	57
2.2.1. Выделение моноцитов из периферической крови [Гольдберг Е.Д. и соавт., 1992]	57
2.2.2. Определение фагоцитарной активности моноцитов крови [Михеенко Т.В., 1990]	57
2.2.3. Оценка экспрессии рецепторов моноцитов.....	58
2.2.3.1. Определение количества $С3^+$ -моноцитов/макрофагов периферической крови [Фрейдлин И.С., 1984]	58
2.2.3.2. Определение количества $Fc\gamma^+$ -моноцитов/макрофагов периферической крови [Земсков В.М. и соавт., 1985]	58
2.2.4. Исследование секреторных способностей мононуклеарных клеток периферической крови	59
2.2.4.1. Культивирование мононуклеарных лейкоцитов периферической крови [Хаитов Р.М. и соавт., 1995].....	59
2.2.4.2. Спектрофотометрический способ определения концентрации нитритов [Green L.C. et al., 1982].....	60
2.2.4.3. Иммуноферментный анализ для количественного определения уровней цитокинов.....	60
2.2.5. Исследование показателя активности и поглотительной способности нейтрофильных гранулоцитов периферической крови [Меньшиков В.В., 1987].....	61
2.2.6. Исследование показателя завершенности фагоцитоза [Меньшиков В.В., 1987]	62
2.2.7. Тест восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест) [Davis S., 1970; Климов В.В., Кошовкина Т.В., 1982].....	62
2.2.8. Приготовление лейкоконцентрата венозной крови [Меньшиков В.В., 1987].....	63
2.2.9. Цитохимические методы исследования лейкоцитов	63
2.2.9.1. Определение содержания гликогена по McManus (ШИК-реакция) [Хэйхоу Дж. Ф.Г., Кваглино Д., 1983]	63

2.2.9.2. Определение содержания липидов по Sheehan, Storey [Хэйхоу Дж. Ф. Г., Кваглино Д., 1983]	64
2.2.9.3. Определение ферментативной активности щелочной фосфатазы по методу Михеева [Меньшиков В.В., 1987]	65
2.2.9.4. Определение содержания неферментного катионного белка по методу М. Г. Шубича [Меньшиков В.В., 1987]	65
2.2.9.5. Определение активности неспецифической эстеразы по Науное, Quaglino [Хэйхоу Дж. Ф. Г., Кваглино Д., 1983]	66
2.2.9.6. Определение ферментативной активности кислой фосфатазы по Goldberg, Varca [Хэйхоу Дж. Ф. Г., Кваглино Д., 1983]	67
2.2.9.7. Определение ферментативной активности миелопероксидазы по Graham-Knoll [Меньшиков В.В., 1987]	67
2.2.10. Статистическая обработка результатов	67
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	69
3.1. Характеристика фагоцитов периферической крови у здоровых людей ...	69
3.1.1. Функциональные особенности моноядерных лейкоцитов периферической крови у здоровых людей	69
3.1.2. Фагоцитарный статус нейтрофильных гранулоцитов у здоровых людей	69
3.2. Характеристика фагоцитов периферической крови у больных клещевым энцефалитом	75
3.2.1. Функциональные особенности моноядерных лейкоцитов периферической крови у больных лихорадочной формой клещевого энцефалита	75
3.2.2. Фагоцитарный статус нейтрофильных гранулоцитов у больных лихорадочной формой клещевого энцефалита	76
3.2.3. Функциональные особенности моноядерных лейкоцитов периферической крови у больных стертой формой клещевого энцефалита ...	78
3.2.4. Фагоцитарный статус нейтрофильных гранулоцитов у больных стертой формой клещевого энцефалита	80
3.2.5. Функциональные особенности моноядерных лейкоцитов периферической крови у больных субклинической формой клещевого	

энцефалита (хроническое персистентное вирусоносительство)	82
3.2.6. Фагоцитарный статус нейтрофильных гранулоцитов у больных субклинической формой клещевого энцефалита (хроническое персистентное вирусоносительство)	82
3.2.7. Функциональные особенности моноядерных лейкоцитов периферической крови у больных хроническим клещевым энцефалитом (полиомиелитическая форма)	83
3.2.8. Фагоцитарный статус нейтрофильных гранулоцитов у больных хроническим клещевым энцефалитом (полиомиелитическая форма)	85
3.3. Характеристика фагоцитов периферической крови у больных инфекцией-микст (хронический рецидивирующий иксодовый клещевой боррелиоз в сочетании с лихорадочной формой клещевого энцефалита)	86
3.3.1. Функциональные особенности моноядерных лейкоцитов периферической крови у больных инфекцией-микст	86
3.3.2. Фагоцитарный статус нейтрофильных гранулоцитов у больных инфекцией-микст	88
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	90
ВЫВОДЫ	122
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	123

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

АГ	–	антиген
АТ	–	антитело
АФК	–	активные формы кислорода
ВКЭ	–	вирус клещевого энцефалита
Г-КСФ	–	гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
ДНК	–	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИКБ	–	иксодовый клещевой боррелиоз
ИЛ	–	интерлейкин
ИФА	–	иммуноферментный анализ
ИФН	–	интерферон
КФ	–	кислая фосфатаза
КЭ	–	клещевой энцефалит
ЛТ	–	лейкотриен
ЛФ	–	лихорадочная форма
М-КСФ	–	моноцитарный колониестимулирующий фактор
МП	–	миелопероксидаза
МХБ	–	моноцитарный хематтрактантный белок
НК	–	натуральные киллеры
НКБ	–	неферментные катионные белки
НСТ	–	тест восстановления нитросинего тетразолия
НЭ	–	неспецифическая эстераза
ПЦР	–	полимеразная цепная реакция
ПАН	–	показатель активности нейтрофильных гранулоцитов
ПСН	–	поглощительная способность нейтрофильных гранулоцитов
ПЗФ	–	показатель завершенности фагоцитоза
РНК	–	рибонуклеиновая кислота
СФ	–	стертая форма
СЦК	–	средний цитохимический коэффициент
СЭИ	–	синдром эндогенной интоксикации
ТАФ	–	тромбоцит активирующий фактор

ТФР	–	трансформирующий фактор роста
ФНО	–	фактор некроза опухоли
ХКЭ	–	хронический клещевой энцефалит
цАМФ	–	циклический аденозин монофосфат
ЩФ	–	щелочная фосфатаза
ЭТС	–	эмбриональная телячья сыворотка
CD	–	cluster differentiation – антигены кластеров дифференцировки клеток
HLA	–	human leukocyte antigens – антигены лейкоцитов человека
Ig	–	immunoglobulin – иммуноглобулин
ICAM	–	inter cellular adhesion molecules – молекулы межклеточной адгезии
NOs	–	NO-синтаза
cNOs	–	конститутивная NO-синтаза
iNOs	–	индуцибельная NO-синтаза
MMR	–	макрофагальный маннозный рецептор
MFR	–	маннозно-фукозный рецептор
MSR	–	scavenger-рецептор
TNFR	–	-рецептор к фактору некроза опухоли
VCAM	–	vascular cellular adhesion molecules – молекулы адгезии клеток к стенке сосуда

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Проблема хронических инфекционных поражений нервной системы является весьма актуальной на протяжении десятков лет. Однако, несмотря на всестороннее изучение вопросов этиологии и клинической картины клещевого энцефалита и иксодового клещевого боррелиоза, ассоциированного с клещевым энцефалитом, механизмов цитопатического действия микроорганизмов, иммунопатологических механизмов реализации инфекционного процесса, в литературе отсутствует целостная картина представлений о влиянии инфектов на реактивность организма при их проникновении в макроорганизм и причины их длительной персистенции в организме [Шаповал А.Н., 1980; Конев В.П., 1995; Иерусалимский А.П., 2001; Коренберг Э.И. и соавт., 2001].

Согласно современным представлениям, патогенез любого инфекционного заболевания, в том числе клещевого энцефалита, представляет сложный динамический процесс реализации патогенных потенций микроба во взаимодействии с многообразными факторами резистентности организма-хозяина [Маянский А.Н., Пикуза О.И., 1993; Бондаренко В.М. и соавт., 1999; Козлов С.С., 1999; Иерусалимский А.П., 2001; Liao Y.C. et al., 2002]. В настоящее время сложилось комплексное представление об иммунофагоцитарной системе периферической крови как о центральном исполнительном инструменте всего каскада антиинфекционного клиренса макроорганизма, при этом заключительные итоги фагоцитарного процесса определяют степень его неспецифической резистентности [Маянский А.Н., Пикуза О.И., 1993; Saito M. et al., 2002]. Однако, несмотря на это, в инфектологии отсутствует целостная картина, характеризующая изменения компонентов неспецифической резистентности в течение и исходе патологических процессов, лежащих в основе вирусных заболеваний [Бондаренко В.М. и соавт., 1999; Chen Y.C., Wong S.Y., 2002].

Основное участие в фагоцитарных реакциях организма принимают полиморфноядерные лейкоциты (нейтрофильные гранулоциты) и система мононуклеарных фагоцитов (моноциты и макрофаги), освобождающие макроорганизм от бактериальных и вирусных патогенов. Моноциты/макрофаги

принимают активное участие в формировании гуморального и клеточного звеньев иммунитета путем перевода поглощенного антигена в высокоиммуногенную форму, презентации его В- и Т-лимфоцитам, интеграции согласованного функционирования всего ансамбля иммунокомпетентных клеток посредством секреции регуляторных цитокинов. Вопрос же об участии нейтрофильных гранулоцитов в элиминации чужеродных эукариотических клеток, прежде всего опухолевых и вирусинфицированных, до недавних пор оставался нерешенным. В настоящее время можно с большой степенью уверенности сказать, что полиморфноядерные лейкоциты обладают способностью проявлять клеточно-опосредованную цитотоксичность в отношении вирусинфицированных клеток, однако для реализации этих механизмов клетки должны быть активированы [Chen Y.C., Wong S.Y., 2002; Drechsler Y. et al., 2002; Saito M. et al., 2002].

Учитывая особенности секретируемых нейтрофильными гранулоцитами и мононуклеарными клетками во внеклеточное пространство регуляторных веществ (лейкотриены, простагландины, интерфероны, интерлейкины, ферменты, активные формы кислорода и оксид азота), можно говорить о наличии у поли- и мононуклеарных лейкоцитов мощного микробицидного цитотоксического потенциала, высокой реактивности и мобилизационной готовности.

Однако необходимо отметить, что данные литературы о структурно-функциональных свойствах клеток при клещевом энцефалите и ассоциированной с ним инфекции крайне немногочисленны и носят, как правило, сугубо описательный характер.

Вместе с тем, представляется совершенно очевидным, что оценка взаимодействия компонентов системы фагоцитов периферической крови с внутриклеточными патогенами может расширить существующие представления об их функциональных возможностях в реализации механизмов неспецифической резистентности организма при вирусных инфекциях. Комплексное же исследование состояния фагоцитарной, бактерицидной и метаболической систем полиморфноядерных и моноядерных лейкоцитов периферической крови при клещевом энцефалите может способствовать прогрессу в изучении патогенеза клещевого энцефалита, а также наметить пути профилактики выявленных нарушений.

Цель исследования. Установить особенности и выявить общие закономерности нарушений функционального статуса фагоцитов периферической крови у больных клещевым энцефалитом и инфекцией-микст.

Задачи исследования:

1. Установить общие закономерности нарушений метаболического и функционального статуса моно- и полиморфноядерных фагоцитов периферической крови у больных клещевым энцефалитом и иксодовым клещевым боррелиозом, ассоциированным с клещевым энцефалитом на фоне проводимой терапии.
2. Выявить особенности фагоцитарной, секреторной, бактерицидной и метаболической функций лейкоцитов периферической крови в зависимости от клинического варианта и характера течения нейроинфекций.
3. Вскрыть механизмы нарушений функционального статуса фагоцитов периферической крови в динамике инфекционного процесса.

Положения, выносимые на защиту:

1. Функциональная дезорганизация конституциональных и индуцибельных свойств моно- и полиморфноядерных фагоцитов периферической крови регистрируется при остром течении клещевого энцефалита, хронической персистенции вируса клещевого энцефалита и сочетании вирусной и бактериальной инфекции (иксодовый клещевой боррелиоз, ассоциированный с клещевым энцефалитом), степень выраженности которой зависит от длительности и активности инфекционного процесса.
2. Несостоятельность фагоцитарного аппарата моноцитов периферической крови при острых вариантах течения клещевого энцефалита обуславливается стойким подавлением экспрессии $С3\beta$ - и $Fc\gamma$ -рецепторов моноцитов, продукции оксида азота и преходящим угнетением фагоцитарной активности клеток. Резервные возможности моноцитов продуцировать ИФН- γ увеличиваются, а ФНО- α и ИЛ-12 угнетаются. Нейтрофильное звено фагоцитарной системы крови характеризуется подавлением ферментативной активности нейтрофильных гранулоцитов при относительной стабильности их фагоцитарной функции на фоне активации поглотительной способности и кислородзависимых бактерицидных систем.

3. Хроническая персистенция вируса клещевого энцефалита индуцирует активацию экспрессии мембранных рецепторов мононуклеарных лейкоцитов и усиление фагоцитарных функций полинуклеарных лейкоцитов при недостаточности их метаболических возможностей и выраженного угнетения индуцибельной продукции оксида азота, ФНО- α , ИФН- γ . Наибольшая значимость этих изменений регистрируется при бессимптомном вирусоносительстве. При хроническом течении клещевого энцефалита критическими эффекторными элементами фагоцитарной функции крови выступают моноциты, вирусопосредованная модуляция свойств которых проявляется в сочетанном угнетении продукции иммуноцитоклинов, фагоцитоза и активности миелопероксидазы.

4. Инфекция-микст сопровождается качественно новыми и количественно иными изменениями, чем вирусная моноинфекция: подавлением фагоцитарного показателя моноцитов, уменьшением содержания субстратов и ферментов в этих клетках и наиболее значительным угнетением продукции ФНО- α , ИФН- γ .

Научная новизна

Впервые проведено комплексное исследование места и роли моно- и полиморфноядерных лейкоцитов периферической крови в патогенезе вирусной моноинфекции (клещевой энцефалит - КЭ) и при сочетании вирусной и бактериальной инфекции (иксодовый клещевой боррелиоз, ассоциированный с клещевым энцефалитом) в динамике заболевания и в зависимости от клинических особенностей нейроинфекций. Конечным итогом изучения явились новые данные, свидетельствующие о дисрегуляции функциональных свойств иммунокомпетентных клеток, реализующихся в дисбалансе их цитокинпродуцирующей, резервной, бактерицидной, метаболической, рецепторнесущей и фагоцитарной активности. Нарушения, обнаруженные в нейтрофильном звене фагоцитарной системы периферической крови, наряду с преимущественно аналогичными по направленности модификациями конституциональных и стимулированных возможностей моноцитарных клеток регистрируются при различных клинических вариантах клещевого энцефалита и инфекции-микст. Степень выраженности функциональной дезорганизации фагоцитов зависит от длительности и активности инфекционного процесса. У

больных клещевым энцефалитом с острым течением заболевания выявляется депрессия рецепторного аппарата моноядерных лейкоцитов и стимуляция секреции провоспалительных цитокинов. Присоединение клещевого энцефалита к иксодовому клещевому боррелиозу индуцирует незначительное подавление экспрессии С3 β рецепторов моноцитов, уровня фагоцитоза и глубокую супрессию выделения провоспалительных цитокинов. Фагоцитарные потенции моноцитов периферической крови активируются при субклинической форме клещевого энцефалита, частично подавляются при хроническом клещевом энцефалите на фоне однонаправленной негативной модуляции секреции цитокинов.

Теоретическое и практическое значение работы. В результате проведенных исследований получены новые данные фундаментального характера, расширяющие существующие на сегодняшний день представления о роли фагоцитарной функции крови в патогенезе клещевого энцефалита и инфекции-микст (хронический иксодовый клещевой боррелиоз в сочетании с лихорадочной формой клещевого энцефалита). Выявленный дисбаланс комплексного состояния бактерицидной, метаболической и цитокинпродуцирующей систем лейкоцитов периферической крови у обследованных лиц может служить необходимой предпосылкой не только для дальнейшего понимания патогенетических связей в развитии инфекционного процесса, но и являться основой разработки путей компенсации нарушенных функций и адаптации к действию данного вирусного агента.

Реализация и апробация диссертации. Материалы диссертации докладывались и обсуждались на региональной научной конференции “актуальные вопросы экспериментальной и клинической морфологии”, посвященной 150-летию чл.-корр. РАН А.С. Догеля (Томск, 2002); на I-ой Всероссийской научной конференции с участием зарубежных специалистов “Актуальные проблемы эволюционной и популяционной физиологии человека” (Тюмень, 2001); на конференции, посвященной 75-летию профессора А.С. Зиновьева (Омск, 2001); на межгородской конференции молодых ученых “Актуальные проблемы патофизиологии” (Санкт-Петербург, 2002); на втором и третьем конгрессах молодых ученых и специалистов “Науки о человеке” (Томск, 2001, 2002) и на научных семинарах кафедры патологической физиологии СГМУ (Томск, 2000-2003).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 16 работ, в том числе 3 в центральных и реферируемых журналах.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 154 страницах машинописного текста и состоит из введения, 4-х глав, выводов и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 16 рисунками и 7 таблицами. Библиографический указатель включает 344 источника, из них 164 отечественных и 180 зарубежных.

Автор выражает глубокую признательность заведующему кафедрой инфекционных болезней, доктору медицинских наук, профессору А.В. Лепехину; профессору кафедры микробиологии СГМУ, доктору медицинских наук М.Р. Карповой; заведующему Центральной научно-исследовательской лаборатории (ЦНИЛ) СГМУ, доктору медицинских наук, профессору А.Н. Байкову; заведующему отделом гематологии ЦНИЛ, доктору медицинских наук Ю.А. Козлову; старшему научному сотруднику отдела гематологии ЦНИЛ, кандидату медицинских наук Н.М. Шевцовой; заведующему отделом иммунологии ЦНИЛ, кандидату медицинских наук Ф.И. Петровскому; старшему научному сотруднику отдела иммунологии ЦНИЛ, кандидату медицинских наук Т.В. Перевозчиковой и научному сотруднику этого же отдела Е.А. Файт; заведующей инфекционной клиникой СГМУ, кандидату медицинских наук, доценту Н.С. Бужак; заведующей инфекционным отделением 3-й городской больницы Г.В. Западаевой; главному врачу медико-санитарной части “Строитель” В.Г. Козлову; заведующему инфекционным отделением того же лечебного учреждения О.В. Бурову; сотрудникам кафедры патологической физиологии СГМУ за ценные теоретические и методические рекомендации, а также большую практическую помощь.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Роль и место фагоцитов периферической крови в инфекционной патологии вирусного происхождения

Дифференцированная реакция клеток фагоцитарного звена в зависимости от биологических свойств возбудителей инфекции играет ведущую роль на этапе инициации инфекционных процессов. Это в значительной степени определяет основные закономерности патогенеза конкретных инфекционных болезней [Исачкова Л.М., Плехова Н.Г., 1997]. Согласно современным исследованиям, факт инфицированности клеток системы мононуклеарных фагоцитов и лимфоцитов различными патогенами, в том числе и флавивирусами, к которым относится вирус клещевого энцефалита (ВКЭ), имеет двойственное значение. С одной стороны, моно- и полинуклеарные лейкоциты являются одними из основных участников неспецифической резистентности организма, с другой стороны, персистенция вируса в указанных клетках представляется в качестве одного из основных механизмов “избегания” вирусами иммунного надзора, при котором репликация вируса осуществляется в заведомо недоступных для элиминации местах [Taliani G. et al., 1997; Харламова Ф.С. и соавт., 2001].

Известно, что достаточная эффективность противовирусного иммунитета находится в прямой зависимости от уровня активности клеток системы мононуклеарных фагоцитов и интерферогенеза, являющихся первичной линией защиты организма от внешней инфекционной атаки. Феномен узнавания вирусных частиц и их элиминация зависят от ряда факторов: функционального состояния мембран, рецепторного аппарата, внутриклеточного метаболизма мононуклеарных фагоцитирующих клеток – макрофагов, гуморального звена фагоцитарной системы (IgM, IgG, компоненты комплемента), а также вирусных частиц, активирующих фагоциты [Маянский Д.Н., 1990; Ляшенко В.А. и соавт., 1995, 1999; Фрейдлин И.С., 1998; Харламова Ф.С. и соавт., 2001]. Согласно современным представлениям, на этапе первичного инфицирования вирусом клещевого энцефалита имеет место поражение как лимфоцитов, так и макрофагальных элементов различной локализации, в том числе и клеток-предшественников. Локализация флавивирусов в иммунокомпетентных клетках и высокая степень их генетической variability обуславливают возникающие нарушения

фагоцитарной функции крови, приводящие к блокировке элиминации вирусных частиц и зараженных вирусом клеток. При этом возникает закономерное предположение, что одним из ведущих факторов формирования длительной персистенции вирусных антигенов и генерализованного поражения тканей у больных клещевым энцефалитом является глубокое повреждение фагоцитарной активности макрофагов, дисбаланс продукции регуляторных цитокинов и нарушение системы интерфероногенеза. Причинами дефектности эффекторных реакций клеток системы мононуклеарных фагоцитов могут быть как факторы конституциональной несостоятельности мембран, рецепторного аппарата и других структур клеток, так и обусловленные влиянием вирусов приобретенные изменения хромосомного аппарата, активных компонентов цитоплазмы, мембран, секреторных потенциалов клеток [Маянский Д.Н., 1993; Фрейдлин И.С., 1998; Лукина Е.А. и соавт., 2000, 2002; Харламова Ф.С. и соавт., 2001, 2002]. В научной литературе приводятся убедительные свидетельства выявления у моноцитов/макрофагов генетически детерминированной резистентности к флавивирусным патогенам [Soren C. Mogensen J., 1985]. Известно, что такая устойчивость кодируется отдельным генетическим локусом (Flv), локализованным на 5 паре хромосом грызунов и находящимся в непосредственной близости от локуса, кодирующего синтазу оксида азота [Ondine J. et al., 2001].

При хронических патологических процессах возрастает роль межклеточных взаимодействий нейтрофилов с иммунокомпетентными клетками [Маянский Д.Н., 1991, 1993; Потапнев М.П., 1995]. Важной патофизиологической особенностью такого взаимодействия являются локализация очага размножения патогена и ограниченный контакт иммунной системы с его антигенами. По данным ряда авторов, хронизация вирусных заболеваний характеризуется в большей степени вовлечением макрофагов и продукцией ими особого спектра хемотаксических факторов, что вызывает привлечение в очаг воспаления не нейтрофилов, а макрофагов [Потапнев М.П., 1995].

1.2. Система мононуклеарных фагоцитов в патогенезе флавивирусных заболеваний

1.2.1. Роль мембранных рецепторов моноцитов/макрофагов в механизмах осуществления их специализированных функций

Макрофаги принимают активное участие в неспецифической защите от патогенов, в раннем воспалительном ответе на инфекцию, в запуске специфического иммунного ответа, в клеточно-опосредованных иммунных реакциях. При этом критерием зрелости и функциональной полноценности клеток может служить количество и разнообразие экспрессируемых на поверхности плазматической мембраны различных рецепторов, потенциально способствующих выполнению моноцитарными клетками фагоцитарной функции. Согласно современным представлениям, фенотип моноцитов/макрофагов представлен различного типа рецепторами.

1. Рецептор для комплексов бактериальных липополисахаридов с липополисахаридсвязывающим протеином сыворотки (CD14), экспрессия которого повышается на макрофагах при воспалении и иммунном ответе; возможно участие его в адгезии моноцитов к эндотелиальным клеткам [Ляшенко В.А., 1989, 1995; И.С. Фрейдлин, 1998, Хаитов Р.М., 2000]. Немаловажно значение рецептора и в патогенезе вирусных заболеваний: CD14-ассоциированная структура поверхности фагоцита играет существенную роль в иницировании флавивирусной инфекции. Так, Y.C Chen et al. [1997, 1999] показали, что связывание CD14 липополисахаридом бактерий блокировало поступление вируса лихорадки Денге в моноциты и являлось критическим моментом для ингибирования репликации вируса внутри клеток, что может играть ведущую роль в патогенезе инфекций-микст. При этом авторы особо отмечают эффект непосредственного связывания липополисахарида с молекулой CD14, а не липополисахарид-опосредованной стимуляции секреции цитокинов и хемокинов (ФНО α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12, ИФН, МИФ).

2. Макрофагальный маннозный (MMR) или маннозно-фукозный (MFR) рецепторы, а также лектиноподобные поверхностные молекулы (LLM) считаются маркерами “альтернативной” активации макрофагов. Активаторами экспрессии рецепторов данного типа являются ИЛ-4, ИЛ-13, ПГЕ, в качестве ингибиторов выступают ИФН- γ , ФНО- α . Рецепторы данного типа опосредуют захват многих патогенов, позволяя моноцитам/макрофагам взаимодействовать с определенными

клетками-мишенями в зависимости от состава поверхностных углеводов [Stein M. et al., 1992; Elbim C. et al., 1994; Потапнев М.П., 1995].

3. Scavenger-рецептор (MSR) – рецептор для производных лигандов сиаловых кислот, посредством которого идет эндоцитоз липопротеинов при превращении макрофага в пенистую клетку [Хаитов Р.М. и соавт., 2000].

4. Семейство Fc-рецепторов (FcR). Комплексное представление о биологии Fc-рецепторов, полученное при анализе современной литературы по данному вопросу, позволяет говорить о ключевой роли рецепторов данного типа в осуществлении многих защитных иммунных реакций организма, таких как пиноцитоз иммунных комплексов, представление антигена, фагоцитоз сенсibilизированных антителами частиц, антителозависимая клеточная цитотоксичность, индукция воспалительных каскадов и модуляция иммунных реакций, FcR-зависимое освобождение медиаторов воспаления [Чередеев А.Н., 1995; Tjelle T.E. et al., 2000; Pleass R.J., Woof J.M., 2001; Drechsler Y. et al., 2002; Garcia-Garcia E. et al., 2002; Ioan-Facsinay A. et al., 2002; Takai T., 2002]. На сегодняшний день известны Fc γ -рецепторы трех типов (Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII), а также FcR для иммуноглобулинов А и Е.

Одним из ключевых моментов в реализации механизмов неспецифической резистентности организма и иммунного ответа является как взаимодействие Fc γ R с комплексом вирус-антитело путем связывания Fc-фрагментов антител, так и непосредственный контакт гликопротеиновых участков оболочки вируса с рецептором [Peiris J.S. et al., 1981; Brandt W.E. et al., 1982; Hasegawa H., 1990; O'Sullivan M.A., Killen U.V., 1994; Чередеев А.Н., 1995; Radaev S., Sun P., 2002; Sonderrmann P., Oosthuizen V., 2002]. Причем образование на поверхности макрофага комплекса антиген-Fc γ R приводит, по данным некоторых авторов, к изменению направления иммунного ответа, смещая его в сторону Th₂ [Anderson C.F., Mosser D.M., 2002].

Мембранным маркером моноцитов/макрофагов являются Fc γ -рецепторы первого типа (CD 64, Mr=71 кД), имеющие высокую аффинность по отношению к мономерному IgG [Unkless J.C., 1989; Чередеев А.Н., 1995]. ИФН- γ , ГМ-КСФ и С5а фрагмент комплемента способны вызвать увеличение уровня Fc γ RI на поверхности моноцитов/макрофагов, в то время как ИЛ-4 и глюкокортикоиды приводят к снижению экспрессии этого рецептора [Girard M.T. et al., 1987; Pan L.Y. et al.,

1990; Te Velde A.A. et al., 1990; Чередеев А.Н., 1995; So E.Y. et al., 2002]. Хотя Fc γ RI можно определить на нормальных неактивированных моноцитарных клетках (так называемая конститутивная экспрессия), количество CD64 значительно увеличивается (в 5 – 10 раз) после обработки клеток γ -ИФН [Pan L.Y. et al., 1990].

В настоящее время известно, что главная роль этого рецептора состоит не только в реализации киллерных реакций типа антителозависимой клеточной цитотоксичности, но и в осуществлении фагоцитарной функции моноцитов/макрофагов [Connor R.I. et al., 1990; Tax W.J., V. Winhe, 1990; Чередеев А.Н., 1995; Pricop L., Salmon J.E., 2002]. Так, A. Ioan-Facsinay et al [2002] показали, что в отсутствие Fc γ RI, IgG-ИК-стимулированные клеточные процессы фагоцитоза, продукция цитокинов, клеточная цитотоксичность и представление антигена подавляются. Кроме того, K. Kurosaka et al [2002] обнаружили, что именно IgG-Fc γ RI-зависимый фагоцитоз апоптотических клеток стимулирует продукцию провоспалительных цитокинов, предотвращая таким образом воспаление.

Молекулярный механизм реализации Fc γ R-зависимого фагоцитоза до сих пор еще детально не изучен. Согласно некоторым данным, Fc γ R-опосредуемый фагоцитоз – сложный процесс, включающий активацию белковых киназ тирозина (семейство SYK, CBL, PI-3), которым можно противопоставить потенциально down-регуляцию белковыми фосфатазами тирозина [Hu B. et al., 2002; Kant A.M. et al., 2002]. E. Garcia-Garcia et al [2002] указывают на важную роль фосфоинозитол-3-киназы и extracellular signal-regulated kinase (ERK) в процессе реализации моноцитами/макрофагами механизмов фагоцитарной активности; R. Jefferis, J. Lund [2002] особо акцентируют внимание на гликозилировании в процессе активации IgG-FcR комплексов.

Несмотря на то, что авидность Fc γ RII (CD 32, M γ =40 кД) по связыванию IgG-сенсibilизированных частиц гораздо ниже, чем у Fc γ RI, данный тип рецепторов моноцитов/макрофагов также выполняет важную роль [Comber P.G. et al., 1989; Unkless J.C., 1989; Чередеев А.Н., 1995; Хаитов Р.М. и соавт., 2000]. Считается, что в нормальных условиях моноциты/макрофаги с экспрессированными на их поверхности Fc γ RII не функционируют; однако при воспалении под влиянием протеолитических ферментов аффинность рецепторов значительно усиливается, и

мононуклеарные фагоциты, несущие Fc γ RII, начинают активно выполнять присущие им зависимые от Fc-рецепторов функции [Larsen G.I., Henson P.M., 1983; Tax W.J. et al., 1990; Хаитов Р.М., 2000]. Кроме того, Fc γ RII могут играть функциональную роль в распознавании иммунных комплексов небольшой молекулярной массы, присоединяя низкомолекулярные иммунные комплексы в концентрациях, в 10 – 100 раз меньших, чем это требуется для Fc γ RI [Comber P.G. et al., 1989; Чередеев А.Н., 1995].

Fc-рецепторы третьего типа экспрессированы на макрофагах в виде трансмембранных молекул Fc γ RIII-TM (CD 16, Mr=55 кД) и выявляются только на активированных формах клеток под воздействием β -ТФР [Unkless J.C., 1989]. Некоторые авторы считают, что поскольку экспрессия Fc γ RIII не изменяется под воздействием γ -ИФН можно считать, что макрофагальные, а тем более моноцитарные Fc γ RIII скорее всего представляют собой дифференцировочные, а не активационные структуры [Чередеев А.Н., 1995; Drechsler Y. et al., 2002].

Не исключается возможность перекрестной адгезии Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII лигандами. Однако стимуляция Fc γ -рецепторов разных типов запускает отличные эффекторные функции моноцитов, регулируя, вероятно, тем самым тип иммунного ответа к различным патогенным воздействиям [Drechsler Y. et al., 2002]

5. Рецепторы для фракций активированного комплемента – CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18) и CR4 (CD11c/CD18). Эти интегрины мембраны макрофагов, кроме компонентов комплемента, могут связывать ряд бактериальных продуктов [Фрейдлин И.С., 1980; 1995; 1998; Хаитов Р.М. и соавт, 2000; Tjelle T. et al., 2002]. Необходимо отметить, что несмотря на участие в фагоцитозе и иммунных реакциях, индукция C3- или Fc- рецепторов стимулируется различными молекулами и таким образом регулируется независимо друг от друга на клеточном уровне [Calcagno M., et al., 1983].

Кроме того, поверхностный фенотип моноцитов/макрофагов представлен антигенами главного комплекса гистосовместимости (CD 74); поверхностными адгезионными молекулами: LFA-1 (CD11a/CD18), LFA-3 (CD 58), ICAM-1 (CD 54), ICAM-2 (CD 102), B7 (CD 80); рецепторами интерлейкина 1 IL-1R (CDw121), туморнекротизирующего фактора TNFR (CDw120a, b), ростового фактора ГМ-КСФ-R (CDw116), гамма-интерферона ИФН- γ R (CDw119); β -интегринами (CD 11a,

CD11b, CD 29) [Ляшенко В.А., 1995; Фрейдлин И.С., 1998; Хаитов Р.М. и соавт., 2000; Itoh H. et al., 2002; Saito M. et al., 2002].

1.2.2. Секреторная активность и вируснейтрализующий потенциал моноцитов/макрофагов

1.2.2.1. Секреторная функция мононуклеарных фагоцитов

Отношения между макрофагами и другими клетками на ранней стадии инфекционного процесса бывают достаточно сложными, подразумевающими взаимную индукцию, в связи с чем о системе мононуклеарных фагоцитов к настоящему времени сложилось представление как о центральном звене в объединении различных типов клеток – участников защитных реакций организма [Романова Ю.М., Гинцбург А.Л., 2000]. Моноциты/макрофаги являются общепризнанными продуцентами цитокинов (монокинов), обладающих разнообразной биологической активностью, участвующих в ауто- и паракринной регуляции функций клеток [Кетлинский С.А., Калинина Н.М., 1995; Фрейдлин И.С., 1995, Васильева Г.И. и соавт., 2000; Романова Ю.М., Гинцбург А.Л., 2000]. В первую очередь макрофагальные цитокины участвуют в неспецифическом звене защиты организма, индуцируя и развивая воспалительные реакции, призванные к деструкции и удалению патологического агента, на основании чего и были выделены провоспалительная (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α , МХБ, ЛХФ, МХАФ) и противовоспалительная (ИЛ-6, ИЛ-10, рецепторный антагонист ИЛ-1, ТФР- β), иммуностимулирующая (ИЛ-1, ИЛ-3, ИЛ-6, ИЛ-12, ИЛ-15, ФНО- α) и иммуносупрессивная (ИЛ-10, ТФР- β , рецепторный антагонист ИЛ-1), гемопоезическая (Г-КСФ и ГМ-КСФ, ИЛ-1, ИЛ-3, ИЛ-6, ИЛ-12, ФНО- α) цитокинзависимые функции моноцитарных клеток [Романова Ю.М., Гинцбург А.Л., 2000; Liao Y.C. et al., 2002; Saito M. et al., 2002; Williams L. et al., 2002].

Действие цитокинов, продуцируемых активированными макрофагами в процессе реализации фагоцитарной функции, определяет основные механизмы неспецифической антиинфекционной защиты на различных этапах развития инфекционного процесса. Согласно современным представлениям, вирусы комплекса клещевого энцефалита являются не только лимфотропными вирусами, но и способны продуктивно инфицировать мононуклеарные лейкоциты независимо

от стадии дифференцированности клеток [Леонова Г.Н. и соавт., 1991; 2000; Chen Y.C., Wong S.Y., 2002]. При этом цитокинсекретирующая функция инфицированных моноцитов/макрофагов отличается уровнем интенсивности продукции, началом, кинетикой, продолжительностью и индукционным потенциалом. Y.C. Chen, S.Y. Wong [2002] в экспериментальном исследовании показали, что инфицированные вирусом лихорадки Денге мононуклеарные фагоциты крови в течение длительного времени активно секретировали ФНО- α , ИФН- α , ИЛ-1 β , ИЛ-8, ИЛ-12, МИФ, однако уровень продукции ИЛ-6, ИЛ-15 и оксида азота был подавлен относительно неинфицированных моноцитов/макрофагов. Добавление в культуру клеток бактериального липополисахарида модулирует секрецию вирусинфицированными макрофагами цитокинов, что может свидетельствовать об изменении патогенеза заболевания при присоединении конкурентной бактериальной инфекции [Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 2000; Chen YC, Wong SY., 2002].

Продуцируемый вирусинфицированными моноцитами/макрофагами периферической крови ИЛ-12 активирует систему мононуклеарных и полинуклеарных фагоцитов, натуральные киллеры, совместно с ФНО обладает способностью индуцировать синтез НК-клетками γ -ИФН, что не только является неотъемлемым звеном противовирусной защиты организма, но и определяет характер иммунного ответа: преимущественное развитие клеточного или гуморального иммунитета [Потапнев М.П., 1995; Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 2000].

1.2.2.2. Роль цитокинов в выполнении моноцитами/макрофагами фагоцитарной функции при вирусных инфекциях

На первых этапах инфекции (в том числе и вирусной), когда в процесс еще не вступили цитотоксические Т-лимфоциты, макрофаги (вместе с НК-клетками) выполняют работу по уничтожению инфицированных клеток-мишеней [Фрейдлин И.С., 1984; Ляшенко В.А., 1989, 1995]. При этом, в начале патологического процесса макрофаги получают ряд внешних стимулов, которые активируют их, увеличивая число и разнообразие поверхностных рецепторов и видоизменяя некоторые биосинтетические процессы внутри клеток [Фрейдлин И.С., 1984; Ляшенко В.А. и соавт., 1989; Маянский Д.Н., 1989; Ляшенко В.А., 1995; Фрейдлин

И.С., 1995; Сходова С.А. и соавт., 2000]. Дифференцировку моноцитов в эффекторные клетки обычно называют макрофагальной активацией [Gessani S. et al., 1993; Фрейдлин И.С., 1995]. Моноциты/макрофаги могут быть активированы различными микробными продуктами, вирусными частицами, цитокинами, иммунными комплексами и др. [Ляшенко В.А., 1995]. Самым сильным специализированным индуктором макрофагальной активации является индикатор острого вирусного воспаления ИФН- γ [Кетлинский С.А. и соавт., 1992; Кетлинский С.А., Калинина Н.М., 1995; Ляшенко В.А., 1995; Фрейдлин И.С., 1995; Delneste Y. et al., 2002; Farrar M., 2003].

Интерфероны играют существенную роль в противоинфекционной защите человека и представлены семейством белков с противовирусной, иммуномодулирующей и противоопухолевой активностью. ИФН образуются в местах скопления репликации вируса и препятствуют накоплению вируса в клетке-мишени. Механизм действия интерферонов направлен на подавление сборки вирусных белков и проявляется на стадии внутриклеточной репликации вируса. С помощью ферментов и ингибиторов ИФН вызывает специфическое торможение транскрипции вирусного генома и подавление трансляции вирусной мРНК, индуцирует образование ингибиторного белка, тормозящего трансляцию вирусной тРНК и размножение вируса. В результате действия интерферонов образуется барьер из неинфицированных клеток вокруг очага вирусной инфекции, что способствует ограничению ее распространения.

Непосредственное участие принимает ИФН- γ и в реализации макрофагами механизмов фагоцитоза, являясь самым сильным специализированным индуктором макрофагальной активации, придавая моноцитам/макрофагам цитотоксические свойства, необходимые для уничтожения зараженных клеток. [Кетлинский С.А. и соавт., 1992; Кетлинский С.А., Калинина Н.М., 1995; Ляшенко В.А., 1995; Фрейдлин И.С., 1995; Delneste Y. et al., 2002; Farrar M., 2003]. Согласно современным исследованиям, индукция дифференцировки моноцитов в макрофаги посредством ИФН- γ происходит быстрее, нежели аутокринная М-КСФ и ИЛ-6 регуляция [Delneste Y. et al, 2002]. Представляет интерес тот факт, что рецептор к ИФН- γ усиленно экспрессируется в ответ на внешнее воздействие γ -ИФН, что сопровождается синтезом интерферонов в самих макрофагах [Ляшенко В.А., 1995].

Один из наиболее существенных путей активации макрофагов под влиянием ИФН- γ – усиление продукции ФНО- α и синергизм ИФН- γ с ФНО- α в стимуляции фагоцитарной активности макрофагов [Nacy S. et al., 1992, 1994; Фрейдлин И.С., 1995]. ИФН- γ и ГМ-КСФ существенно повышают экспрессию FcR, СЗв на мембране моноцитов/макрофагов. При этом усиливается так называемый иммунный фагоцитоз объектов, опсонизированных специфическими антителами [Girard M.T. et al., 1987; Pan L.Y. et al., 1990; Te Velde A.A. et al., 1990; Чередеев А.Н., 1995; So E.Y. et al., 2002]. Кроме того, ИФН- γ может кооперироваться с ГМ-КСФ и при индукции усиленного респираторного взрыва в макрофагах, с которым связывают повышение их микробицидности [Shen L. et al., 1994; Фрейдлин И.С., 1995; Huang Y. et al., 2000; Rossini A., 2002].

ИФН- γ , хорошо известный как мощный активатор макрофагов, способен регулировать функции зрелых нейтрофилов: усиливать фагоцитоз и бактерицидность нейтрофильных гранулоцитов, антителозависимую и антителонезависимую цитотоксичность, одновременно оказывая тормозящее влияние на миграцию нейтрофилов [Потапнев М.П., Печковский Д.В., 1994; Щепеткин И.А. и соавт., 1994]. ИФН оказывает примиряющее действие на продукцию активных форм кислорода нейтрофилами в ответ на стимуляцию опсонизированным зимозаном. ИФН- γ вызывает экспрессию поверхностного Fc γ RI [Потапнев М.П., Печковский Д.В., 1994]. Быстрая нормализация числа нейтрофилов после элиминации инфекционного начала связана с функционированием ИФН/Г-КСФ системы, регулирующей нейтрофилопоз по принципу обратной связи [Щепеткин И.А. и соавт., 1994].

При острых вирусных заболеваниях γ -ИФН рассматривается как индикатор острого процесса, а хроническая вирусная персистенция протекает с увеличением уровня циркулирующего в крови ИЛ-4 при уменьшении продукции моноцитами ИФН- α [Al-Wabel A. et al., 1993; Потапнев М.П., 1995; Chaturvedi U.C. et al., 1999; Liu T., Chambers T.J., 2001; Yang K.D. et al., 2001].

Изучение продукции интерферонов у больных флавивирусными инфекциями (лихорадка Денге, эпидемическая, геморрагическая лихорадки и др.) показало во всех случаях достоверно более высокую концентрацию вышеуказанных цитокинов [Sittisombut N. et al., 1991; Ho L.J. et al., 2001; Liu T., Chambers T.J., 2001].

Особо следует отметить, что активность и потенциал ИФН детерминированы, и в случае присутствия в организме микст-инфекции пула интерферонов, необходимых для подавления репликации вируса, может быть недостаточно, что особенно проявляется у лиц с иммунодефицитными состояниями [Sittisombut N. et al., 1991].

M. Saito et al [2002] показали, что ГМ-КСФ модулирует цитокин-продуцирующую функцию мононуклеарных фагоцитов, уменьшая секрецию ФНО- α и ИЛ-12 и усиливая секрецию ИЛ-10 и МХБ-1, что отчасти может способствовать длительной персистенции вируса в организме и хронизации инфекционного процесса. Обнаружение в сыворотке крови больных флавивирусными инфекциями повышенного уровня ГМ-КСФ свидетельствует о возможности репликации вируса в клетке-хозяине [Hober D. et al., 1998; de Villers W. et al., 1994; Kurane I. et al., 2000; Подымов С.Д., 2002].

Изучение влияние вируса японского энцефалита на активность моноцитов периферической крови позволило ряду авторов выявить увеличение продукции hMDF (МХБ), играющего в воспалительном очаге критическую роль в пополнении моноцитов/макрофагов, и модулирующего, кроме того, дифференцировку моноцитов в макрофаги [Singh A. et al., 2000; Biswas S.K., Sodhi A., 2002; Omata N., 2002].

Исследование ТФР- β в стадии инициации воспаления показало, что данный медиатор также может играть роль хематтрактанта для моноцитов. В этот период он стимулирует пролиферацию моноцитов в ответ на действие ГМ-КСФ, М-КСФ, может способствовать дифференцировке моноцитов в макрофаги, урегулировать экспрессию FcR, даже стимулировать продукцию провоспалительных монокинов (ФНО- α , ИЛ-1, ИЛ-6) и продукцию самого ТФР- β уже макрофагами [Bosco M.C. et al., 1994; Cassatella M. et al., 1994; Celeda A., Mahi R.A., 1992; Fan K. et al., 1992; Shull M. et al., 1994; Кетлинский С.А., Калинина Н.М., 1995; Фрейдлин И.С., 1998].

K.J. Woollard et al [2002] указывают на роль С-реактивного белка в активации и адгезии моноцитов, которые играют немаловажное значение в иммунном воспалении.

Не менее значимым в реализации моноцитами/макрофагами фагоцитарной функции является МИФ - провоспалительный и иммуномодуляторный цитокин,

повышающий уровень адгезивности. МИФ стимулирует экспрессию макрофагами белков гистосовместимости второго класса, синтез ФНО, перекиси H_2O_2 и оксида азота (NO), оказывающих микробицидное и цитотоксическое действие [Ляшенко В.А., 1995; Spain-Santana T.A. et al., 2001; Chen Y.C., Wong S.Y., 2002]. Исследования T. Suzuki et al. [2000] показали возможность up-регуляции вирусом японского энцефалита экспрессии макрофагами МИФ.

Активация макрофагов, связанная с продукцией и секрецией весьма агрессивных радикалов и молекул, должна быть под жестким контролем для предупреждения массивных повреждений клеток и тканей организма. Поэтому система активирующих, деактивирующих и ингибирующих цитокинов участвует в позитивной и негативной регуляции процессов активации макрофагов [Langermans J. et al., 1992; Фрейдлин И.С., 1995].

При длительной вирусной персистенции, проявляя себя как противовоспалительный цитокин, в качестве антагониста ИФН- γ может выступать ТФР- β (при накоплении достаточного его количества), эндогенный синтез которого резко возрастает в активированных макрофагах, особенно под влиянием ИЛ-2 [Nacy S. et al., 1992, 1994; Фрейдлин И.С., 1995]. В этот период он препятствует адгезии лейкоцитов к эндотелию, супрессирует секрецию макрофагами супероксидных радикалов, монокинов (ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО- α), ингибирует продукцию главного активатора моноцитов – ИФН- γ [Shull M. et al., 1994; Фрейдлин И.С., 1995]. Факт увеличения ТФР- β у больных хроническими флавивирусными инфекциями (хронический гепатит С) отражает слабую противовирусную активность основных медиаторов воспаления. В качестве механизма длительной персистенции вируса в организме авторы [Dinarello C., 1991; С.Д. Подымов, 2002] предлагают как непосредственное подавление ТФР-1 β экспрессии генов провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ФНО- α), так и индукцию синтеза растворимых рецепторов к ним.

Известно, что под влиянием ИЛ-4, ИЛ-13, ПГЕ макрофаг может приобретать “асимметричный” фенотип с избирательной активацией “scavenger” рецепторов, рецепторов типа MMR, MFR, LLM [Stein M. et al., 1992]. Однако действие ИФН- γ , ФНО- α характеризуется down-регуляцией вышеперечисленных рецепторов на фоне повышения бактерицидности, цитотоксичности и проявления других признаков

усиленной функциональной активности клеток. Возможно, таким образом происходит переключение активированных макрофагов на более эффективный фагоцитоз через FcR, C3R или на внеклеточную микробицидность, связанную с секрецией супероксидных радикалов в микроокружение. По мнению И.С. Фрейдлин [1995], дальнейшая up-регуляция MMR, MFR, LLM цитокинами необходима для вновь рекрутированных моноцитов/макрофагов, обеспечивающих неспецифический клиренс.

Другой вариант фенотипа активированного макрофага характеризуется пониженной экспрессией генов провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ФНО- α , MCP-1), пониженной цитотоксичностью, но при том усиленной действием ИЛ-19 (по данным Liao Y.C. et al., 2002) продукцией ИЛ-6. Возможно, это ИЛ-6 формирует фенотип макрофага, функционирующего в затухающем очаге воспаления, играя роль негативного звена цитокиновой регуляции активности макрофагов, усиливая продукцию РАИЛ, ингибируя секрецию макрофагами ИЛ-1 и ФНО- α [Maimone D. et al., 1993; Кетлинский С.А., Калинина Н.М., 1995; Фрейдлин И.С., 1995; Borgmann S. et al., 2002; Liao Y.C. et al., 2002; Tilg H. et al., 2002].

Даже такой общепризнанный активатор макрофагов, как ИФН- γ , может выступать в качестве антагониста другого стимулирующего лимфокина – ИЛ-2 при регуляции продукции моноцитами ИЛ-8 (мощного хемоаттрактанта для нейтрофилов), которую ИЛ-2 стимулирует, а ИФН- γ ингибирует. Физиологический смысл такого антагонизма может быть связан с необходимостью негативной регуляции продукции ИЛ-8 в момент переключения с нейтрофильной инфильтрации очага воспаления на моноцитарно-макрофагальную. Этому может способствовать позитивная регуляция тем же ИФН- γ продукции макрофагального хемоаттрактанта МХБ-1, при этом для продукции ИЛ-8 и МХБ-1 в моноцитах крови должны быть задействованы разные пути активации [Фрейдлин И.С., 1995; Ляшенко В.А., 1995; Потапнев М.П., 1995; Baggiolini M. et al., 1997; Biswas S.K., Sodhi A., 2002; Borgmann S. et al., 2002; Omata N. et al., 2002].

Естественно, что в процессе развития инфекции функции макрофагов могут быть не только активированы, но и подавлены. В частности, страдают синтез и рецепция цитокинов, что в конечном итоге приводит к нарушению реализации

клетками фагоцитарной функции. Согласно современным исследованиям в области инфекционной иммунологии существуют примеры дисрегуляции цитокиновой сети и регулируемых ею макрофагов, вызванной патологическим действием инфекционных агентов [Schreurs J. et al., 1993; Фрейдлин И.С., 1995]. Механизмы нарушения системы цитокиновой регуляции активности клеток, обуславливающих высокую устойчивость внутриклеточных паразитов к микробицидному действию макрофагов, могут быть различны [Reiner N., 1994; Фрейдлин И.С., 1995; Biswas S.K., Sodhi A., 2002; Myers J.T., Swanson J.A., 2002; Sordet O. et al., 2002; Hu B. et al., 2002; Kant A.M. et al., 2002]. Недостаток цитокинов может быть связан с функциональным Т-иммунодефицитом. Следует отметить, что различная степень Т-иммунодефицита развивается при ряде инфекций, в том числе и вирусных [Ляшенко В.А., 1995]. При некоторых хронических заболеваниях в организме появляются макрофаги со свойствами супрессоров функций Т-лимфоцитов. Высказывается предположение, что угнетающим Т-лимфоциты фактором являются простагландины, или же им может быть образуемый макрофагами NO [Ляшенко В.А. и соавт., 1989; Ляшенко В.А., 1995].

Отдельной проблемой для обсуждения является персистенция возбудителей инфекционных заболеваний в макрофагах, характерная для хронических инфекций [Ляшенко В.А., 1995].

Таким образом, конечный эффект действия того или иного цитокина на макрофаг в большой степени зависит от комплекса факторов. Важную роль при этом играет, в частности, присутствие других цитокинов, ингибиторов, антагонистов, синергистов, инфекционных агентов, их компонентов или продуктов, гормонов, нейротрансмиттеров и т.д., а также состояние клетки-мишени (стадии дифференцировки, выраженность нарушений структуры и метаболизма, экспрессия соответствующих рецепторов, инфицированность) [Hamilton J., 1993 ; Фрейдлин И.С., 1995; Burke F. et al., 2003].

1.2.2.3. Роль оксида азота при флавивирусных инфекциях

В последние годы в связи с открытием роли реакций образования оксида азота как посредника в межклеточных взаимодействиях и цитотоксического эффектора противоинфекционной защиты организма, взгляды на некоторые аспекты неспецифической противоинфекционной резистентности организма претерпели значительные изменения [Flynn R. et al., 1990]. В частности, было доказано, что при влиянии целого ряда патогенных микроорганизмов на человека и биологические экспериментальные модели, NO^{\bullet} является одним из главных “орудий” антипатогенной активности фагоцитов, участвуя в обеспечении резистентности организма [Evans T.J. et al., 1996; Проскуряков С.Я. и соавт., 2000].

Синтез NO^{\bullet} индуцируется специальными ферментами - NO-синтазами (NOs). В настоящее время известно два вида NO-синтаз: конститутивная (cNOs) и индуцибельная (iNOs). iNOs в норме в клетках практически не обнаруживается, однако ее синтез в макрофагах, полиморфноядерных лейкоцитах, гепатоцитах, фибробластах, клетках желудочно-кишечного тракта стимулируется под действием провоспалительных и антипатогенных факторов – ИФН- γ , ФНО- α , бактериального липополисахарида. При этом одним из наиболее изученных путей индукции экспрессии индуцируемой NO-синтазы является связывание ФНО- α с его растворимым рецептором TNFR1-p55, который обеспечивает проникновение цитокина в макрофаг. Оксид азота реализует противоопухолевый и антимикробный потенциал клеток, подавляя размножение и инкубацию возбудителей в клетках-резервуарах организма-хозяина [Lin I.Y., Chadee K, 1992; Garsia I. et al., 1993; Barker J.E. et al., 1998; Проскуряков С.Я. и соавт., 2000].

В последние годы было показано, что оксид азота, известный мощными бактерицидными и опухолецидными свойствами, выступает также как медиатор антивирусной защиты. В связи с этим в литературе широко обсуждается вопрос о роли оксида азота при флавивирусных инфекциях. S.K. Saxena et all [2000, 2001] показали, что при японском энцефалите в начальной стадии заболевания значительно увеличивался как уровень индуцибельной NO-синтазы, так и уровень базальной секреции NO^{\bullet} соответственно. Причем предварительная обработка мышей, инфицированных вирусом японского энцефалита, L-NMMA значительно увеличивала смертность от данной флавивирусной инфекции. Однако Y.C. Chen,

S.Y. Wong [2002] в экспериментах с длительным культивированием инфицированных вирусом лихорадки Денге моноцитов/макрофагов не установили изменения уровня продукции оксида азота. В современной литературе приводятся доказательства противовирусной активности молекулы NO[•] *in vitro* и *in vivo* в качестве фактора неспецифической резистентности, в частности, к флавивирусам [Karupiah T.R. et al., 1993; Lin Y.L. et al., 1997; Reiss C.S., Komatsu T., 1998; Andrews D.M. et al., 1999]. G. Bagetta et al [1997], D.M. Grzybicki et al [1997] обнаружили поздние эффекты РНК-содержащих вирусов и вирусных белков на экспрессию Nos2 и Nos1 в нервной ткани грызунов. Этими авторами не исключается преобладающее значение продукции NO[•] в патогенезе хронических инфекционных заболеваний, чем при острых воспалительных процессах.

Биохимический анализ репликации вируса японского энцефалита в культуре клеток показал, что NO[•] способен замедлять синтез рибонуклеиновой кислоты вируса, накопление вирусных белков и выход вируса из инфицированных клеток [Lin Y.L. et al., 1997, 2000].

Известно, что вирусные частицы, посредством индукции синтеза ИФН и влияния на функциональную активность макрофагов могут или стимулировать, или down-регулировать продукцию NO[•] [Kreil T.R., Eibl M.M., 1995, 1998]. Так, в экспериментальных исследованиях показано, что ИФН- γ стимулирует синтез оксида азота инфицированными ВКЭ макрофагами [Kreil T.R., Eibl M.M., 1995]. По данным S.K. Saxena et al [2001], повышенный уровень NO-синтазы коррелирует с уровнем ФНО- α в ранней стадии инфекции. Однако добавление в культуру ФНО- α и ИФН- γ приводит к down-регуляции синтеза радикала, что, вероятно, является следствием мимикрирования эффекта стимулирования вирусной инфекцией синтеза NO[•] эндогенным ИФН- β [Kreil T.R., Eibl M.M., 1995].

Кроме того, имеющиеся сведения о влиянии ингибиторов NOс на развитие инфекционного процесса однозначно указывают на то, что подавление синтеза NO[•] приводит к существенному обострению течения болезни [Проскуряков С.Я. и соавт., 2000].

Таким образом, NO[•] является одним из факторов, играющих ключевую роль в естественной резистентности организма хозяина, ограничивающего начальную стадию вирусной инфекции [Lin Y.L. et al., 1997, 2000].

1.3. Нейтрофильные гранулоциты периферической крови в патогенезе инфекционных заболеваний

1.3.1. Рецепторный аппарат полиморфноядерных лейкоцитов

Одним из фундаментальных механизмов противоинфекционной защиты макроорганизма является фагоцитоз, важную роль в котором играют полиморфноядерные лейкоциты. Считается, что они одними из первых входят в контакт с чужеродным агентом и поэтому по степени их фагоцитарной способности можно судить об активации неспецифической резистентности.

На протяжении всего периода изучения клинической картины клещевого энцефалита определенный интерес проявлялся к исследованию картины крови при данном инфекционном заболевании, однако, согласно данным ряда авторов, динамика изменений лейкоцитарной формулы при КЭ не имеет определенной направленности и зависит от формы и стадии заболевания [Шаповал А.Н., 1980; Иерусалимский А.П., 2001]. Известно, что флавивирусные инфекции сопровождаются преходящими нарушениями гемопоэза, и, в зависимости от стадии инфекционного процесса, могут вызывать развитие как нейтропении, так и нейтрофилии. Гистопатологическое исследование костного мозга у больных вирусной геморрагической лихорадкой выявило к 5-7 дню заболевания минимальную активность гранулоцитарного ростка кроветворения, сопровождающуюся виремией [La Russa V.F., Innis B.L., 1995]. Однако при этом остаются неясными особенности фагоцитарной активности полиморфноядерных лейкоцитов в процессе реализации механизмов неспецифической резистентности при клещевом энцефалите.

Нейтрофильные гранулоциты, являясь основными эффекторами воспалительной защитной реакции организма человека, относятся к короткоживущим клеткам, жизненный цикл которых определяет участие нейтрофилов в острых воспалительных реакциях [Потапнев М.П., 1995; Хаитов Р.М. и соавт., 2000; Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 2000]. Пребывание нейтрофильных гранулоцитов в крови составляет около 10 часов, что представляет для клеток лишь способ перемещения от места образования к месту специфической функции [Пальцин А.А., 1988; Маянский А.Н., 1993; Маянский А.Н., Пикуза О.И., 1993].

Значение полинуклеарных фагоцитов до последнего времени ограничивалось только их эффекторной функцией в антителозависимых реакциях [Маянский А.Н., Пикуза О.И., 1993; Маянский А.Н., 1995; Васильева Г.И. и соавт., 2000]. Однако, нейтрофильные гранулоциты способны распознавать не только бактериальные, но и чужеродные молекулы вирусов, грибов, простейших, опухолевых клеток даже без участия антител как механизма приобретенного иммунитета [Потапнев М.П., 1995]. Так, фагоцитоз вирусов даже в составе иммунных комплексов может осуществляться путем распознавания вирусных антигенов рецепторами нейтрофилов, отличными от Fc-рецепторов, взаимодействующих с модифицированными Fc-участками иммуноглобулинов [Потапнев М.П., 1995].

От состояния рецепторного аппарата нейтрофилов зависят процессы адгезии и фагоцитоза бактерий, вирусов и других болезнетворных агентов и циркулирующих иммунных комплексов.

Рецепторный аппарат зрелых нейтрофилов разнообразен и включает в себя поверхностные HLA-антигены класса I (A, B, C), маркеры CD13, CD14, молекулы адгезии CD11a,b,c/CD18, Fc γ -рецепторы (CD32, CD16, CD64), рецепторы к компонентам комплемента CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18), CR4 (CD11c/CD18) [Печковский Д.В., Потапнев М.П., 1994; Тотолян А.А., Фрейдлин И.С., 1999].

Взаимодействие комплексов антиген-антитело с клетками иммунной системы приводит к возникновению эффекторных функций, к которым относятся антителозависимая цитотоксичность, дегрануляция клеток, фагоцитоз и ответ на иммуномодулирующие сигналы, а также функции, определяющие пролиферацию лимфоцитов и секрецию антител. Все эти взаимодействия инициируются через присоединение Fc-области антител или иммунных комплексов к специализированным рецепторам на нейтрофилах [Чередеев А.Н., 1995; Галактионов В.Г., 1998].

Разнообразие ответа клеток на антитела или иммунные комплексы достигается за счет структурной гетерогенности FcR. Было показано, что FcR имеют структурно сходные между собой связывающие домены, однако трансмембранные и внутриклеточные части этих рецепторов могут значительно различаться по структуре. Это, по-видимому, и обуславливает различие в

проведении внутриклеточных сигналов [Пальцев М.А., Иванов А.А., 1995; Чередеев А.Н., 1995; Югай М.М., Каральник Б.В., 1999].

Благодаря получению моноклональных антител к различным типам FcR, удалось показать, что Fcγ-рецепторы можно разделить на 3 основных класса: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16) [Югай М.М., Каральник Б.В., 1999; Чередеев А.Н., 1999].

FcγRI играют ключевую роль в осуществлении многих защитных иммунных реакций организма. Эти реакции включают в себя пиноцитоз иммунных комплексов, фагоцитоз сенсibilизированных антителами частиц и антителозависимую клеточную цитотоксичность. Помимо этого, FcγRI нейтрофильных гранулоцитов контролируют освобождение некоторых медиаторов воспаления [Маянский А.Н., 1985, 1993, 1995].

C3β-рецепторы представляют собой гликопротеины и являются независимыми от Fc-рецепторов [Chenoweth D.E., Hugli T.E., 1980; Ройт А., 1991; Серов В.В., Пауков В.С., 1995; Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 1995; Тотолян А.А., Фрейдлин И.С., 2000]. В иммунном прилипании к циркулирующим иммунным комплексам среди всех рецепторов комплемента они играют большую роль [Ройт А., 1991]. C3β-R расположены поверхностно на плазматической мембране и их активность может со временем восстанавливаться при нарушении структурной целостности цитолеммы [Маянский А.Н., 1999]. C3β-рецепторы, связывая активные фракции комплемента, опосредуют иммунную адгезию, иммунный фагоцитоз активных нейтрофилов, а также усиление секреции лизосомальных гидролаз [Чередеев А.Н., 1995].

Как известно, фагоцитарный процесс состоит из ряда последовательных, взаимосвязанных и взаимообусловленных стадий: движение, адгезия, поглощение, дегрануляция, образование активных форм кислорода и азота, киллинг и расщепление объекта фагоцитоза. Нарушение любой из этих стадий может приводить к развитию и хронизации инфекционных процессов различной степени тяжести.

1.3.2. Механизмы хемотаксиса и адгезии лейкоцитов к очагу повреждения

Хемотаксис обеспечивает быстрое накопление фагоцитов в месте проникновения инфекционного агента. Изучение секреции основных хемотаксических факторов нейтрофильных гранулоцитов активированными моноцитами/макрофагами, эндотелиальными клетками стенок кровеносных сосудов, дендритными клетками у больных флавивирусными инфекциями (японский энцефалит, геморрагическая лихорадка, клещевой энцефалит) позволило выявить увеличение продукции ИЛ-1, ИЛ-8, ФНО- α , ГМ-КСФ, Г-КСФ, ТАФ, что создает тот цитокиновый фон, который наряду с патогеном вызывает цепь событий, ведущих к миграции нейтрофилов из кровеносного русла и формированию очага острого воспаления [Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 1995; Hober D, et al., 1996, 1998; Avirutnan P. et al., 1998; Chaturvedi U.C. et al., 1999; Huang Y.H. et al., 2000; Ho L.J. et al., 2001; Bosch I. et al., 2002; Chen Y.C., Wang S.Y., 2002]. При этом в качестве хемоаттрактантов нейтрофилов могут также выступать также N-формилпептиды, компоненты комплемента (C3a и C5a), лейкотриены (ЛТ В4) [Harvath L., 1994; Потапнев М.П., 1995; Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 1995; Avirutnan P. et al., 1998; Васильева Г.И. и соавт., 2000].

Нарушения хемотаксиса наблюдаются как при врожденных заболеваниях в составе сложных синдромов, так и при вторичных (приобретенных) иммунодефицитных состояниях, одной из причин развития которых может явиться хроническая вирусная инфекция [Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 1995].

Как правило, хемоаттрактанты усиливают не только движение, но и экспрессию на мембране фагоцитов молекул адгезии, то есть хемотаксис и адгезия являются взаимосвязанными процессами, что приводит к фагоцитозу патогена, дегрануляции нейтрофилов, сопровождающейся выбросом в фагосомы или во внешнюю среду протеолитических ферментов, формирование аутокринного пути регуляции активности клеток [Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 1995; Потапнев М.П., 1995]. Кроме того, Е.Г. Редчиц, В.О. Гузева [1991] указывают на особое значение среди индукторов адгезии лейкотриена В4, ТАФ, адениновых нуклеотидов (АТФ, аденозина, цАМФ), отмечая их важную роль посредника в адгезивном эффекте ряда медиаторов [Zimmerman G.A., McYntyre T.M., 1988].

По мнению ряда авторов, адгезивная способность нейтрофилов усиливается в присутствии ФНО- α , ФНО- β , но подавляется в присутствии ИЛ-1 и ИЛ-2 [Ferrante A., 1992; Потапнев М.П., 1995]. Однако вопрос о влиянии ИЛ-1 на хемотаксис и адгезию нейтрофилов остается спорным. Так В.Г. Конусовой и соавт. [2002] постулируется, что хотя ИЛ-1 и является хемоаттрактантом для нейтрофилов при введении его в организм, этот его эффект является опосредованным. По-видимому, под влиянием ИЛ-1 происходит активация ряда клеток, включаются каскадные взаимодействия между цитокинами: инициируется продукция таких веществ, как ИЛ-6, ИЛ-2, которые в свою очередь вызывают продукцию ИЛ-8, ФНО и т.д., являющихся непосредственными эффекторами воспалительной реакции [Щепеткин И.А. и соавт., 1994; Конусова В.Г. и соавт., 2002]. Нарушение адгезивных свойств фагоцитирующих клеток ведет к неспособности последних мигрировать в зону проникновения патогенного агента. Как и в случае хемотаксиса, снижение адгезивных свойств нейтрофилов наблюдается при многих инфекциях вирусной, грибковой и бактериальной природы. Однако, по мнению Р.М. Хаитова, Б.В. Пинегина [1995], понижение как хемотаксиса, так и адгезии фагоцитирующих клеток является скорее не первопричиной, а следствием наличия у этих больных инфекционного процесса.

1.3.3. Бактерицидные системы нейтрофилов

Киллинг микроорганизмов осуществляется путем активации кислородзависимых и кислороднезависимых систем полиморфноядерных лейкоцитов [Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 1995].

Кислороднезависимый механизм

Гибель и разрушение патогена происходят под влиянием кислой реакции среды фаголизосомы, гидролитических ферментов и большого числа микробицидных белков и пептидов, то есть опосредованы действием лизосомальных ферментов, нейтральных протеаз, неферментных катионных белков, лизоцима, лактоферрина, освобождающихся вследствие дегрануляции [Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 1995; Рябинченко Е.В. и соавт., 2000].

Установлено, при развитии инфекционного процесса, обусловленного персистенцией флавивирусов в организме, наблюдается активация

кислороднезависимых механизмов бактерицидности полиморфноядерных лейкоцитов [Khanna N. et al., 1993; Srivastava C. et al., 1999; Lin Y.L. et al., 2000].

В настоящее время особо важное значение придается дефензинам (гранулярные клеточные протеины), обладающим широким спектром противомикробной активности в отношении микробов, вирусов, грибов [Gabay J.E., Almeida R.P., 1993; Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 1995; Киселева Е.П. и соавт., 2002; Славинский А.А., 2002]. По данным некоторых авторов, дефензины обладают способностью встраиваться в липидный бислой мембраны, нарушать ее проницаемость [Кокряков В.Н. и соавт., 1989; Плехова Н.Г., Исачкова Л.М., 1997]. Наряду с этим, некоторыми авторами указывается ведущая роль дефензинов нейтрофильных гранулоцитов в качестве физиологического медиатора, способного регулировать функциональную активность моноцитов, активировать комплемент по классическому пути, [Плехова Н.Г., Исачкова Л.М., 1997; Долгушин И.И. и соавт., 2000; Киселева Е.П. и соавт., 2002].

Кислая фосфатаза подвергает кислотному гидролизу бактерии, умерщвленные воздействием миелопероксидазной системы, катионных белков, лизоцима, лактоферрина [Хейхоу Ф.Г., Кваглино Д., 1983; Асадов Ч.Д. и соавт., 1990]. Известно, что при развитии инфекционного процесса наблюдается повышение уровня активности кислой фосфатазы нейтрофилов у больных острыми и хроническими как бактериальными, так и вирусными инфекциями; однако при бактериальных инфекциях активность фермента возрастает более интенсивно, чем при заболеваниях вирусной этиологии [Бондарев Л.С. и соавт., 1973; Бурая Т.Л. и соавт., 1991].

Механизм действия щелочной фосфатазы на бактерии заключается в гидролизе нуклеиновых кислот и фосфопротеинов [Шубич Ф.Г., Нагоев Б.С., 1980; Асадов Ч.Д. и соавт., 1990]. Показатели активности щелочной фосфатазы при многих патологических состояниях дают полезную для диагностики информацию [Хейхоу Ф.Г., Кваглино Д., 1983; Vorregaard N. et al., 1987, 1995, 1997; Маянский А.Н., 1989; Sengelov N. et al., 1992, 1993; Тотолян А.А., Фрейдлин И.С., 2000; Славинский А.А., 2002]. Известно, что активность щелочной фосфатазы при бактериальной инфекции значительно возрастает, вместе с тем, при вирусных инфекциях активность данного фермента изменяется не однозначно. Так, по

данным Л.С. Бондарева и соавт. [1973], при вирусном и серозном менингите активность фермента практически не отличалась от нормы, а при вирусном гепатите резко снижалась.

Лактоферрин проявляет выраженные бактерицидные и антипролиферативные действия благодаря своей способности создавать среду, дефицитную по ионам железа. Выступая в качестве иммунорегулятора с провоспалительным эффектом, лактоферрин активирует НК-клетки, повышает цитотоксичность, фагоцитоз и продукцию супероксидных радикалов моноцитами/макрофагами, активирует адгезию и продукцию гидроксильных радикалов нейтрофилами. С другой стороны, лактоферрин подавляет продукцию провоспалительных цитокинов мононуклеарами крови и синтез антител *in vitro* [Киселева Е.П. и соавт., 2002].

Не исключено, что одним из возможных дефектов фагоцитирующей клетки может являться не явное снижение количества того или иного фермента, участвующего в киллинге патогена, а нарушение синтеза его активных форм и связанная с этим функциональная недостаточность ферментативной активности [Бурая Т.Л. и соавт., 1991]. По данным Р.М. Хаитова, Б.В. Пинегина [1995], способность нейтрофильных гранулоцитов осуществлять киллинг существенно снижена при стафилококковых инфекциях, хроническом пиелонефрите, хронических заболеваниях респираторного тракта, что, вероятно, может приводить к более тяжелому течению инфекционного заболевания и к хронической персистенции возбудителя в организме.

Кислородзависимый механизм

Бактериальная и вирусная инфекции способствуют активации окислительного метаболизма фагоцитов, в процессе которого формируются токсичные метаболиты кислорода и азота [Gougerot-Pocidalo M.A. et al., 2002]. Дефект системы активации обуславливает длительную персистенцию патогенов. Напротив, неконтролируемый выброс оксидантов вызывает поражение тканей [Рябинченко Е.В. и соавт., 2000].

Основой кислородзависимого механизма киллинга патогена является способность фагоцитов к респираторному взрыву. Активация этого метаболического пути происходит в течение нескольких секунд после стимуляции фагоцитов поглощенными опсонизированными частицами, фрагментами бактериальных клеток, комплементом и цитокинами [Рябинченко Е.В. и соавт.,

2000] и характеризуется резким увеличением потребления кислорода и активацией гексозо-монофосфатного шунта, поставляющего восстановленный NADPH для основной реакции респираторного взрыва, катализируемой NADPH-оксидазой [Vaissiere C. et al., 1999; Рябинченко Е.В. и соавт., 2000; Славинский А.А., 2002; Gougerot-Pocidallo M.A. et al., 2002]. В процессе окислительного метаболизма генерируются мощные биооксиданты - супероксиданион радикал, перекись водорода, синглетный кислород и гидроксильный радикал - основные бактерицидные агенты фагоцитов. Продукция гипероксида водорода обуславливает цитостатическую активность нейтрофилов [Щепеткин И.А. и соавт., 1994]. В нейтрофилах при функционировании системы миелопероксидазы образуется гипохлорит-ион, также обладающий высокой реакционной активностью [Кулаков В.В. и соавт., 1997; Рябинченко Е.В. и соавт., 2000]. Получены доказательства высокого уровня корреляции между образованием активных форм кислорода и деградацией микроорганизмов [Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 1995]. В результате неполноценности оксидазной системы лейкоциты не способны к киллингу патогенов, следствием чего является рецидивирующий инфекционный процесс [Рябинченко Е.В. и соавт., 2000].

Респираторный взрыв считается наиболее мощным средством разрушения поглощенных микроорганизмов [Мацнер Я., 1993]. Однако, повышение оксидантного статуса не означает одновременного увеличения бактерицидных свойств фагоцитирующих клеток. Так, у септических больных отмечается увеличение продукции кислородных метаболитов при значительном снижении фагоцитарной и бактерицидной активности клеток [Рябинченко Е.В. и соавт., 2000]. Возможно, внеклеточный выброс оксидантов, наблюдаемый в этом случае, задействует все энергетические ресурсы клеток, определяя их неполноценность и, как следствие, персистенцию агента в организме [Рябинченко Е.В. и соавт., 2000].

Предположительно, механизм поражения микробной клетки кислородными радикалами заключается в нарушении проницаемости мембран, вызванное модификацией углеводов, белков и липидов кислородными метаболитами, а также нарушение структуры нуклеиновых кислот. К таким модификациям относятся галогенирование, декарбоксилирование аминокислот, разрыв липидных связей, окисление сульфгидрильных групп, активация перекисного окисления липидов

кислородными радикалами [Рябинченко Е.В. и соавт., 2000].

Миелопероксидаза (МП) - маркерный фермент азурофильных гранул - катализирует образование хлорноватистой кислоты и других токсических агентов, губительно действующих на большинство бактерий [Асадов Ч.Д. и соавт., 1990; Ройт А., 1991; Маянский А.Н., 1993; Серов В.В., Пауков В.С., 1995; Меньшиков В.В., 1986; Arnljots K. et al., 1998; Vorregaard N. et al., 2001; Славинский А.А., 2002]. У больных острой бактериальной инфекцией отмечалось существенное повышение уровня спонтанной и индуцированной активности миелопероксидазы. В то же время у больных с хронической герпетической инфекцией на фоне исходно высокой активности миелопероксидазы наблюдалось снижение активности внутриклеточно расположенной МП и индекса стимуляции МП, что свидетельствовало о преобладании процессов экскреции фермента над синтезом активных форм его [Бурая Т.Л. и соавт., 1991].

Согласно исследованиям ряда авторов, у больных острыми флавивирусными инфекциями (японский энцефалит, геморрагическая лихорадка) в стадию разгара заболевания наблюдается усиление кислородзависимых механизмов бактерицидности, проявляющееся интенсификацией внутриклеточных окислительных процессов с генерацией перекиси аниона, активацией цитозольной NADPH и последующим образованием перекиси водорода [Khanna N. et al., 1993; Srivastava S. et al., 1999; Lin Y.L. et al., 2000]. При этом представлены интересные данные, касающиеся прямого действия активных форм кислорода, генерируемых в процессе респираторного взрыва, на денатурацию вирусных белков и деструкцию нуклеиновой кислоты, сопровождающуюся образованием разрывов в цепи [Srivastava S. et al., 1999; Рябинченко Е.В. и соавт., 2000].

Роль активных метаболитов кислорода состоит, с одной стороны, в повышении фагоцитарной функции клеток, с другой – в их медиаторной и модуляторной функциях. Медиаторная роль активных форм кислорода обусловлена их способностью вызывать перекисное окисление липидов, окисление белков, углеводов, повреждение нуклеиновых кислот. Модуляторная роль активных метаболитов кислорода может заключаться как в усилении провоспалительных явлений (путем индукции высвобождения ферментов и взаимодействия с ними в повреждении ткани), так и противовоспалительных

эффектов (за счет инактивации лизосомальных гидролаз и других медиаторов воспаления). Большое значение играют активные формы кислорода и в поддержании хронического процесса.

1.3.4. Роль цитокинов в регуляции фагоцитарной активности нейтрофилов при действии инфекционных агентов

Важная функция цитокинов в очаге воспаления – обеспечение способности нейтрофилов максимально реализовать свою противоинфекционную функцию [Потапнев М.П., 1995]. Продемонстрирована способность цитокинов усиливать противоинфекционное действие нейтрофилов прямо или опосредованно через моноциты, лимфоциты, нелимфоидные активированные клетки [Campbell P.A., 1990; Потапнев М.П., Печковский Д.В., 1992; Печковский Д.В. и соавт., 1993; Потапнев М.П., 1995]. Так, бактерии и их продукты служат мощными стимуляторами синтеза ИЛ-12 макрофагами, который, в свою очередь, стимулирует дифференцировку Т-клеток в Th_1 , вызывает активацию лимфоцитов (преимущественно НК), усиливающих бактерицидные свойства нейтрофилов в отношении фагоцитированных бактерий [Потапнев М.П., Печковский Д.В., 1992; Потапнев М.П. и соавт., 1994; Потапнев М.П., 1995].

Показана способность цитокинов стимулировать и отдельные механизмы антимикробного действия нейтрофилов: ИЛ-1 β , γ -ИФН, ФНО α усиливают преимущественно фагоцитоз бактерий, но не их киллинг [Потапнев М.П., 1995]. ИЛ-6, наоборот, проявляя как провоспалительный цитокин сходную с ИЛ-1 и ФНО- α биологическую активность в отношении нейтрофилов, имеет, однако, ряд функциональных особенностей [Васильева Г.И. и соавт., 2000]. В отличие от ИЛ-1 и ФНО- α , ИЛ-6 усиливает не поглотительную, а киллерную активность нейтрофилов, действуя преимущественно в постактивационном периоде жизни [Печковский Д.В. и соавт., 1993; Васильева Г.И. и соавт., 2000]. Изучение продукции ИЛ-6 при флавивирусных инфекциях показало повышенную его концентрацию в супернатанте клеток в первые дни заболевания с последующей нормализацией к периоду реконвалесценции [Chaturvedi U.C. et al., 1999; Soemanto V.E. et al., 1999]. Причем, согласно исследованиям ряда авторов, наиболее активно секретировали ИЛ-6 эндотелальные клетки, но не моноциты/макрофаги и

дендритные клетки [Chaturvedi U.C. et al., 1999; Soemanto B.E. et al., 1999; Huang Y.H., et al., 2000; Ho L.J. et al., 2001; Chen Y.C., Wong S.Y., 2002].

Роль цитокинов на данном этапе приобретает двойственный характер. С одной стороны, они выступают в качестве факторов, вызывающих дальнейшую активацию (гиперактивацию) нейтрофилов, что чревато истощением функциональных возможностей клеток [Elbim C. et al., 1994; Потапнев М.П., 1995]. В связи с этим активированные нейтрофилы могут сами регулировать степень своей чувствительности к монокинам, сбрасывая в состоянии активации рецепторы к ним. Снижение экспрессии рецепторов может происходить как в результате шеддинга, так и путем их интернализации внутрь клетки. Слущенные с поверхности Нф рецепторы становятся своеобразными ловушками для цитокинов, снижая уровень их воздействия на чувствительные клетки, что показано, например, для рецепторов к ЛТ В4, ТАФ, ФНО- α [Ferrante A. et al., 1992; Потапнев М.П., 1995; Васильева Г.И. и соавт., 2000]. Появление таких “растворимых” рецепторов отмечается, однако, и при патологических состояниях; в этом случае они выступают в качестве “ловушек” для цитокинов, регулируя таким образом уровень цитокинового воздействия на чувствительные клетки [Потапнев М.П., 1995].

С другой стороны, цитокины поддерживают жизнеспособность и предотвращают апоптоз нейтрофилов, что продемонстрировано для ИЛ-1 β , ГМ-КСФ, Г-КСФ, γ -ИФН, но не для ИЛ-8 [Druker B.J. et al., 1994; Потапнев М.П., 1995]. Представляет интерес тот факт, что цитокины с противовоспалительным действием (ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-13, ТФР- β) способны оказывать свое действие путем подавления транскрипции генов цитокинов воспаления в нейтрофилах и усилением деградации мРНК [Cassatella M.A. et al., 1994; Потапнев М.П., 1995]. Описан и функциональный путь блокады действия цитокинов воспаления на нейтрофилы со стороны противовоспалительных цитокинов. Так, стимулированные нейтрофилы продуцируют не только ИЛ-1 β , но и РАИЛ, способный связывать цитокин без проведения активирующего сигнала внутрь клетки [Jenkins J.K. et al., 1994; Потапнев М.П., 1995]. Продукция РАИЛ резко усиливается в присутствии ИЛ-4, ИЛ-10 [Потапнев М.П., 1995]. ИЛ-13 усиливает экспрессию на поверхности нейтрофилов и появление растворимых молекул ИЛ-1-рецептора типа II, которые, связываясь с молекулами цитокина, снижают концентрацию ИЛ-1, действующего

на полноценный ИЛ-1-рецептор типа I нейтрофилов [Colotta F. et al., 1994; Потапнев М.П., 1995]. ИЛ-6, действуя преимущественно в поствакцинальном периоде, может индуцировать апоптоз нейтрофильных гранулоцитов, может выступать как антагонист провоспалительных цитокинов, ингибируя их синтез, супрессируя ряд стимулирующих эффектов этих цитокинов в отношении нейтрофилов и индуцируя продукцию эндогенных антагонистов, например РАИЛ. Таким образом, ИЛ-6 способен играть роль негативного фактора в сети цитокиновой регуляции активности нейтрофильных гранулоцитов и формировать фенотип нейтрофила, функционирующего в затухающем очаге воспаления [Васильева Г.И. и соавт., 2000].

Похожее негативное действие на функции нейтрофильных гранулоцитов оказывают и такие противовоспалительные цитокины, как ИЛ-10, супрессирующий продукцию практически всех провоспалительных цитокинов, и трансформирующий фактор роста (ТФР- β), препятствующий адгезии лейкоцитов к эндотелию и ингибирующий секрецию супероксидных радикалов [Berkman N. et al., 1995; Васильева Г.И. и соавт., 2000].

1.3.5. Нейтрофилокины в механизмах неспецифической резистентности

Взаимодействие между клеточными элементами иммунофагоцитарной системы занимает одну из ключевых позиций в процессе развития антиинфекционной резистентности организма [Плехова Н.Г., Исачкова Л.М., 1997].

При изучении межклеточного взаимодействия фагоцитирующих клеток посредством цитокинов, нейтрофилы рассматриваются в роли клеток-мишеней для мононуклеарных лейкоцитов. Тем не менее, процесс смены клеточных реакций в очаге воспаления заставляет несколько по-иному оценить степень участия этих клеток в антиинфекционной резистентности организма [Плехова Н.Г., Исачкова Л.М., 1997]. Показано, что в очаге воспаления наряду с тканевыми макрофагами, главными инициаторами воспаления, существенную роль в борьбе с инфекцией приобретают и другие клеточные элементы, прежде всего нейтрофилы и естественные киллеры [Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 2000].

Установлено, что стимулированные полиморфноядерные лейкоциты способны секретировать в кровотоки большое количество цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-3,

ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12, ФНО- α , ГМ-КСФ, α -ИФН, ТАФ), которые выступают в качестве модуляторов воспалительного процесса и участвуют в каскадной сети регуляции иммуногенеза [Bazzoni F. et al., 1990, 1991; Au V.T. et al., 1994; Долгушин И.И. и соавт., 1995; Потапнев М.П., 1995; Дадаева А.А. и соавт., 1997; Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 2000]. При этом в качестве индукторов синтеза нейтрофилами цитокинов могут выступать лейкотриены и сами цитокины, в том числе эндогенного происхождения [Потапнев М.П., 1995]. Кроме крупномолекулярных белков, интактные и стимулированные нейтрофильные гранулоциты секретируют и более мелкие молекулы пептидной природы [Долгушин И.И., 1986, 1995; Плехова Н.Г., Исачкова Л.М., 1997]. Необходимо отметить, что цитокинообразующая функция нейтрофилов, как и у остальных лейкоцитов, служит для аутокринного и паракринного регуляторных взаимодействий с окружающими клетками: присутствие подобных биологически активных веществ обуславливает стимуляцию функциональной активности моноцитов/макрофагов и повышение резистентности организма к инфекциям [Долгушин И.И., 1986; Кокряков В.Н. и соавт., 1989; Потапнев М.П., Печковский Д.В., 1994; Плехова Н.Г., Исачкова Л.М., 1997]. Хотя сведения о регуляторной функции нейтрофилов в отношении иммунокомпетентных клеток при развитии флавивирусных инфекций в современной литературе немногочисленны, можно предположить наличие у нейтрофильных гранулоцитов способности представлять антиген лимфоцитам, стимулировать пролиферацию лимфоцитов и усиливать антителопродукцию [Дадаева А.А. и соавт., 1997].

В настоящее время уделяется особенное внимание увеличению при персистенции в организме флавивирусов продукции ИЛ-8 - одного из центральных регулирующих звеньев в хематтракции лейкоцитов [Ляшенко В.А., 1993, 1995, 1998; Потапнев М.П., Печковский Д.В., 1994; Cassatella M. et al., 1994; Baggiolini M. et al., 1994; Потапнев М.П., 1995; Avirutnan P. et al., 1998; Васильева Г.И. и соавт., 2000; Huang Y.H. et al., 2000; Тотолян А.А., 2001; Конусова В.Г. и соавт., 2002; Bosch I. et al., 2002; Chen Y.C., Wang S.Y., 2002]. Направленная миграция Нф в очаг поражения происходит в результате связывания ИЛ-8 с рецепторами CXCR1, CXCR2, CXCR4, приводящего к активации сократительного цитоскелета клеток и образованию широких цитоплазматических ламелл [Baggiolini M. et al.,

1987, 1994; Васильева Г.И. и соавт., 2000; Тотолян А.А., 2001]. Известно, что ИЛ-8 увеличивает в 10 раз экспрессию на поверхности Нф адгезивных молекул семейства β_2 -интегринов, главным образом CD11/CD18 (CR3), и повышает в 200 раз их аффинитет к связываемым лигандам (ICAM 1, 2, 3), усиливая адгезивность нейтрофильных гранулоцитов и облегчая их миграцию в очаг повреждения [Потапнев М.П., Печковский Д.В., 1994; Васильева Г.И. и соавт., 2000]. ИЛ-8 увеличивает связывание нейтрофильных гранулоцитов с эритроцитами, покрытыми липидом А, повышая тем самым эффективность адгезии нейтрофилов к бактериям. В современной литературе имеются сообщения о способности ИЛ-8 угнетать адгезию нейтрофилов к монослою эндотелиальных клеток, активированных ЛПС, что, как полагают авторы, сопряжено с шеддингом L-селектина [Khabar K.S. et al., 1997; Тотолян А.А., 2001]. Не исключено, что данное обстоятельство может приносить свой вклад в механизмы развития микст-инфекций при первоначальном заражении бактериальным агентом.

Необходимо отметить, что ИЛ-8 посредством регулирования синтеза метаболитов фосфатидилинозитола плазматической мембраны также вызывает у нейтрофилов повышение содержания внутриклеточного свободного Ca^{2+} , уровень которого является одним из ключевых пунктов механизма адгезии путем активации сократительной системы (полимеризации нитей актина) и транспорта рецепторов адгезии на поверхность мембраны [Редчиц Е.Г., Гузева В.О., 1991; Потапнев М.П., 1995; Васильева Г.И. и соавт., 2000].

В самом очаге воспаления ИЛ-8 выступает как быстродействующий активатор лейкоцитов, обуславливающий их дегрануляцию, развитие респираторного взрыва, выход лизосомальных ферментов, увеличение экспрессии поверхностных рецепторов, продукцию и секрецию нейтрофилами арахидоновой кислоты и ее метаболитов [Потапнев М.П., Печковский Д.В., 1994; Фредлин И.С., 1995; Васильева Г.И. и соавт., 2000; Тотолян А.А., 2001; Конусова В.Г., 2002]. ИЛ-8 индуцирует высвобождение ферментов и других белков из внутриклеточных органелл нейтрофилов, при этом экзоцитоз специфических гранул сопровождается повышенной экспрессией на поверхности клеток CR3 CD11b/CD18, p150, 95, CD11c/CD18, а также CR1 [Тотолян А.А., 2001].

ГМ-КСФ и ФНО- α (по данным некоторых авторов в синергизме с ИЛ-1) непосредственно и опосредованно через индукцию ИЛ-8, NAP-2 в очаге воспаления активируют нейтрофилы, стимулируя образование в них супероксидных форм кислорода, дегрануляцию, инициацию синтеза и секреции лизосомальных ферментов, лейкотриенов, бактерицидных факторов (окись азота, гипохлорная кислота), способных оказывать повреждающее действие как на патоген, так и на окружающие ткани [Щепеткин И.А. и соавт., 1994; Потапнев М.П., 1995; Кулаков В.В. и соавт., 1997; Васильева Г.И. и соавт., 2000]. При этом, к первичному активирующему влиянию ФНО- α относят взаимодействие его со специфическим рецептором, активацию протеинкиназ, фосфорилирование специфических белков, активацию метаболизма фосфолипидов мембраны нейтрофилов, освобождение арахидоновой кислоты и биосинтез лейкотриенов посредством взаимодействия ФНО-рецепторов с гупнинсвязывающими белками (G-белки) и протеинкиназами [Потапнев М.П., Печковский Д.В., 1994; Щепеткин И.А. и соавт., 1994].

Более поздние реакции ФНО- α на нейтрофил заключаются преимущественно в стимуляции экспрессии на поверхности полиморфноядерных лейкоцитов адгезивных молекул, опосредованном увеличении хемоаттракции нейтрофильных гранулоцитов, путем индукции синтеза ИЛ-8 и других хемотактических молекул, усилении фагоцитоза опсонизированных бактерий, активации антителозависимой клеточной цитотоксичности, цистостатического эффекта и цитолитических свойств клеток, обусловленных продукцией гипероксида водорода, секрецией миелопероксидазы, β -глюкуронидазы, лизоцима.. Однако O_2 -зависимый и особенно O_2 -независимый путь их киллинга, сопровождающийся дегрануляцией нейтрофилов, при активации Нф ФНО- α увеличиваются незначительно [Щепеткин И.А. и соавт., 1994; Потапнев М.П., 1995; Васильева Г.И. и соавт., 2000]. Нейтрофилы после фагоцитоза бактерий теряют большую часть рецепторов к ФНО- α [Ferrante A. et al., 1992; Потапнев М.П., 1995].

ГМ-КСФ приводит к достаточно быстрому нарастанию нейтрофильного лейкоцитоза, модулирует функции зрелых нейтрофилов, усиливая экспрессию ответственного за адгезию поверхностного белка (p), стимулируя хемотаксис,

фагоцитоз и бактерицидную активность нейтрофилов, подвижность нейтрофилов, продукцию активных форм кислорода. Однако есть основания предполагать, что действие ГМ-КСФ при инфекционном процессе скорее отражается на функциональном состоянии зрелых нейтрофилов, чем на интенсивности гранулоцитопозеза [Потапнев М.П., Печковский Д.В., 1994; Щепеткин И.А. и соавт., 1994].

ГМ-КСФ, действуя на нейтрофильные гранулоциты, обладает способностью преимущественно усиливать “респираторный взрыв” и особенно синтез белков O_2 -независимого пути киллинга микробов и дегрануляцию нейтрофилов [Потапнев М.П., Печковский Д.В., 1994; Потапнев М.П., 1995]. ГМ-КСФ, активируя нейтрофилы, индуцирует в них появление мРНК и секрецию ИЛ-1, обладающего провоспалительными и иммунорегуляторными свойствами [Потапнев М.П., 1995].

1.4. Краткая характеристика клещевого энцефалита

1.4.1. Эпидемиология и этиология клещевых нейроинфекций

Клещевой энцефалит (КЭ) - это нейроинфекция, характеризующаяся высокой летальностью, грубыми остаточными явлениями и переходом в хроническую форму. Первое клиническое описание болезни было дано в 1936-1940 годах рядом отечественных ученых [Горчаковская И.Н., 1959; Шаповал А.И., 1961; Иерусалимский А.П., 2001].

Клещевой энцефалит относится к группе природно-очаговых болезней человека. Для данного заболевания характерна строгая весенне-летняя сезонность заболевания [Бирнер М.О., 1982; Лобзин Ю.В., Казанцева А.П., 1997; Иерусалимский А.П., 2001]. В городе Томске заболевания клещевым энцефалитом регистрируются с третьей декады апреля по первую декаду ноября, при этом максимальное количество случаев приходится на май – июнь [Кондратьев В.Г. и соавт., 1998]. Сезонность заболеваемости энцефалитом полностью обусловлена численностью и активностью иксодовых клещей в природе: максимальная активность иксодид наблюдается в весенние месяцы, в конце лета бывает второй небольшой подъем численности активных клещей, связанный с появлением новой генерации, но никогда не достигающий весеннего уровня.

Основным резервуаром и переносчиком вируса в природе являются иксодовые или таежные клещи (семейство Ixodidae, подотряд паразитирующих клещей Parasiformes) [Шаповал А.И., 1980; Смородинцев А.А., Дубов А.В., 1986; Левина Л.С., Погодина В.В., 1988; Лобзин Ю.В., Казанцева А.П., 1997]. Основными хозяевами и переносчиками вируса КЭ являются пять видов иксодовых клещей: *Ixodes persulcatus*, *Ixodes ricinus*, *Dermacentor silvarum*, *Haemophysalis concinna* и *Haemophysalis japonica* [Иерусалимский А.П., 2001]. Наибольшее распространение и эпидемиологическое значение имеют первые два вида клещей [Лобзин Ю.В., Казанцева А.П., 1997; Иерусалимский А.П., 2001].

Заражение человека в подавляющем большинстве случаев происходит при укусах клещей. На этот путь инфицирования приходится порядка 80 % заболевших [Шаповал А.И., 1980; Иерусалимский А.П., 2001]. В 1949 году А.И. Шаповалом было высказано мнение о возможности существования внеклещевых путей инфицирования. И действительно, позднее были показаны и другие способы передачи вируса, а именно: алиментарный путь заражения (при употреблении сырого молока животных, инфицированных через укусы клещей во время пастбы), трансплацентарное заражение плода. Некоторые авторы указывают на возможность заражения клещевым энцефалитом воздушно-капельным путем. Нужно отметить, что раздавливание насосавшихся клещей с возможным занесением вируса на слизистые оболочки глаз и поврежденные участки кожи также не исключает возможности заболевания клещевым энцефалитом.

В различных природных очагах зараженность клещей вирусом клещевого энцефалита колеблется в очень широких пределах: от 1–3% в естественных очагах до 50–58% в антропоургических [Горчаковская И.Н., 1959; Шаповал А.И., 1980; Шувалова Е.П., 1995; Иерусалимский А.П., 2001].

Заболеванию КЭ в равной степени подвержены мужчины и женщины всех возрастных групп, несмотря на то, что по статистическим данным среди инфицированных преобладают мужчины.

Ареал клещевого энцефалита и иксодового клещевого боррелиоза простирается от Тихого до Атлантического океана и охватывает территорию 3-х азиатских и 18-ти европейских стран дальнего зарубежья, а также ряд стран СНГ. Особенно неблагоприятная обстановка с заболеваемостью КЭ складывается на

Урале, в Сибири, на Дальнем Востоке [Шаповал А.Н., 1980; Verkkoniemi A. et al., 1997; Кондратьев В.Г. и соавт., 1998; Nuttall P.A., 1999; Kaiser R., 2000; Logar M. et al., 2000; Иерусалимский А.П., 2001; Cisak E. et al., 2001; Han X. et al., 2001; Jaussaud R. et al., 2001; Lindgren E., Gustafson R., 2001; Ormaasen V. et al., 2001; Randolph S., 2001; Zabicka J, 2001]. В.И. Злобин [1996; 1998], Л.М. Исачкова и соавт. [1998] отмечают особую тяжесть заболевания и высокий уровень смертности на Дальнем Востоке.

Число заболевших неуклонно возрастает год от года: с 1,5 до 6,6 на 100 тысяч населения за период с 1990 по 1999 год. В Томске заболеваемость горожан за последние 10 лет увеличилась в 1,7 раза [Кондратьев В.Г. и соавт., 1998; Иерусалимский А.П., 2001].

Природно-очаговая инфекция клещевого энцефалита этиологически связана с вирусом клещевого энцефалита из семейства *Flaviviridae*, экологически относящимся к арбовирусам, переносимым членистоногими (так называемым *arthropod borne virus*). Семейство вирусов *Flaviviridae* в настоящее время выделено из семейства *Togaviridae* и состоит из трех родов: флавивирусов (*Flavivirus*), пестивирусов (*Pestivirus*) и вирусов гепатита С и G (*Hepacivirus*) [Шаповал А.Н., 1980; Monath T.P.; Первигов Ю.В. и соавт., 1982; Гольдберг Е.Д. и соавт., 1992; Rice C.M. et al., 1996; Лобзин Ю. В., Казанцева А.П., 1997; Мельников В.Г. и соавт., 1998; Solomon T., Mallewa M., 2001]. В комплекс вирусов КЭ входят: вирус клещевого энцефалита, вирус шотландского энцефалита овец, вирусы омской геморрагической лихорадки, кнассанурской лесной болезни, Негоши, Лангат, Повассан, Алма-Арасан, Апон и Ройял-фарм [Сморозинцев А.А., Дубов А.В., 1986; Злобин В.И. и соавт., 1996; Ecker M. et al., 1999; Pazdiora; P. et al., 2000; Иерусалимский А.П., 2001; Barrett A.D., 2001; Hayasaka D. et al., 2001; Takashima I. et al., 2001]. Возбудитель острого и хронического клещевого энцефалита — вирус клещевого энцефалита — как и вирионы всех флавивирусов, имеет сферическую форму диаметром до 50–60 нм, покрытую гликопротеиновой спиккулами, содержащими гемагглютинины. Внутри внешней оболочки размещается вирусный иксоэдральный капсид — геномный нуклеопротеиновый комплекс, покрытый коровым белком, диаметром около 30 нм. Оболочка флавивирусов защищает геном вируса от внутриклеточных протеаз. В своем составе вирусная частица со-

держит 66% белка, 8% РНК, 17% липидов и 9% углеводов [Лобзин Ю.В., Казанцева А.П., 1997; Покровский В.И., Поздеев О.К., 1998; Иерусалимский А.П., 2001].

Геном флавивирусов в составе нуклеокапсида представлен одной молекулой однонитчатой РНК положительной полярности общей длиной около 11 тыс. нуклеотидов, которые кодируют полипептидную цепь длиной 3,4–3,6 тыс. аминокислотных остатков [Сафронов П.Ф. и соавт., 1990]. Репликативный цикл тогавирусов реализуется в цитоплазме инфицированных клеток; последовательность стадий репликации типична для всех представителей семейства *Flaviviridae* - геномная РНК является инициатором инфекционного процесса и служит матрицей для создания дочерних копий [Плетнев А.Г. и соавт., 1986; Плетнев А.Г. и соавт., 1989; Покровский В.И., Поздеев О.К., 1998; Иерусалимский А.П., 2001].

В ходе развития флавивирусов в зараженных клетках синтезируется ряд неструктурных вирусных белков, входящих в состав “растворимого” антигенного комплекса, большинство из которых связано с процессами репликации РНК и процессингом белков [Плетнев А.Г. и соавт., 1986; Плетнев А.Г. и соавт., 1989; Морозова О.В., 2000, 2001].

Несмотря на то, что ВКЭ характеризуется широким клеточным тропизмом, механизм проникновения в клетку флавивирусов остается во многом непонятным. Согласно данным литературы, вирус попадает в клетки рецептор-опосредованным эндоцитозом, причем можно выделить высокоаффинное и низкоаффинное связывание [Иерусалимский А.П., 2001]. В качестве специфических рецепторов ВКЭ на поверхности клеток может выступить ламининовый рецептор человека. Также предполагается, что в организме сорбция и дальнейшее необратимое связывание вириона с клеткой может быть опосредовано С3 компонентом комплемента, Fc детерминантой иммуноглобулинов или с участием специфических антител, когда уровни их концентрации ниже, чем нейтрализующие титры [Rice S.M. et al., 1996]. Поглощенные путем эндоцитоза вирионы быстро сливаются с лизосомами. Однако попавший в лизосомы вирус избегает переваривания благодаря особым свойствам белков внешней оболочки, которые способствуют слиянию липидных бислоев вируса и лизосомы при кислых значениях рН. Это

обстоятельство позволяет нуклеокапсиду покинуть лизосому и попасть в клеточный цитозоль [Сморозинцев А.А., Дубов А.В., 1986; Иерусалимский А. П., 2001]. Согласно современным представлениям о ходе развития флавивирусных инфекций, выход вируса из инфицированных клеток осуществляется либо с помощью экзоцитоза, используемого для секреции, либо может быть опосредован индукцией комплемент-зависимого лизиса клеток [Филдс Б., Найп Д. М., 1989].

1.4.2. Патогенез клещевого энцефалита

ВКЭ проникает в организм человека через кожу при укусе клеща или через пищеварительный и желудочно-кишечный тракты в случае алиментарного инфицирования при приеме зараженного вирусом молока. В первом случае местом первичного размножения вируса являются кожа и подкожная клетчатка; при алиментарном заражении происходит быстрая фиксация вируса не только в эпителиальных клетках верхнего отдела пищеварительного тракта, но и в тканях желудочно-кишечного тракта [Шаповал А.И., 1980; Погодина В.В., 1986; Смородинцев А.А., Дубов А.В., 1986; Левина Л.С., Погодина В.В., 1988; Лобзин Ю.В., Казанцева А.П., 1997; Покровский В.И., Поздеев О.К., 1998; Иерусалимский А.П., 2001]. В месте инокуляции происходит накопление вируса не только вследствие непрерывного поступления, но и размножения его в фибробластах и мышечных волокнах, коже и подкожной клетчатке [Шаповал А.И., 1980; Смородинцев А.А., Дубов А.В., 1986]. Затем, как в первом, так и во втором случаях, начавшийся репродуцироваться в области входных ворот ВКЭ в дальнейшем, проникая через капилляры в систему крово- и лимфообращения, начинает размножаться в эпителии кровеносных и лимфатических сосудов, лейкоцитах крови и вместе с ними попадает и размножается в органах иммунной системы, ретикулоэндотелиальной системы, в клетках печени, почек и селезенки, то есть местом размножения вируса КЭ могут служить ткани, происходящие от всех трех зародышевых листков [Панов А.Г., 1956; Albrecht P., 1962; Шаповал А.И., 1980; Смородинцев А.А., Дубов А.В., 1986; Иерусалимский А.П., 2001]. Интенсивно размножаясь во внутренних органах, вирус может постепенно проникать в периферическую и центральную нервную системы [Шаповал А.И., 1980; Смородинцев А.А., Дубов А.В., 1986; Иерусалимский А.П., 2001]. В отдельных

случаях преобладание способа диссеминации вириона отражается в клинических особенностях КЭ [Лобзин Ю.В., Казанцева А.П., 1997]. Вопрос о том, преимущественно через гематогенный, лимфогенный или невральные пути вирус попадает в мозговые структуры ЦНС, до сих пор остается предметом дискуссии среди исследователей. Так, общее распространение вируса и вирусемия, наблюдавшаяся регулярно в инкубационном периоде, подчеркивает быстрый гематогенный путь его внедрения [Albrecht P., 1962; Погодина В.В., 1986; Иерусалимский А.П., 2001]. Однако, основываясь на результатах экспериментальных работ, ряд авторов указывают на отсутствие доказательств прямой резорбции вируса из ткани в кровь и, следовательно, отдается предпочтение первично лимфогенному пути распространения вируса [Иерусалимский А.П., 2001]. Учитывая тот факт, что значительная часть вирусов находится внутри лимфоидных клеток лимфатических узлов, целесообразно относить ВКЭ к лимфотропным вирусам с особо выраженным сродством к иммунокомпетентным клеткам [Горчаковская И.Н., 1959; Шаповал А.И., 1980; Смородинцев А.А., Дубов А.В., 1986; Иерусалимский А.П., 2001]. Невральные пути распространения вируса, по мнению ряда авторов, в данных условиях играют второстепенную роль [Albrecht P., 1962]. Учитывая быстроту и диффузность поражения центральной нервной системы, элективность вируса к нервной системе, высказываются предположения о невральном механизме продвижения вируса, однако происходит ли это по осевым цилиндрам или периферически эндоневрально по лимфатическим сосудам на настоящий момент остается неясным [Сергеева Г.И., Левкович Е.Н., 1966; Левкович Е.Н., 1981; Иерусалимский А.П., 2001]. Ю.В. Лобзин, А.П. Казанцева [1997] указывают на возможность инвазии ЦНС также и невральным путем посредством центростремительного распространения вируса через обонятельный тракт. Не исключено, что в зависимости от гетерогенности антигенных свойств клещевого пула вируса, может реализоваться тот или иной путь проникновения отдельных штаммов вируса в ликвор и определенные отделы ЦНС.

Согласно сведениям литературы, основным звеном патогенеза клещевого энцефалита, определяющим тяжесть состояния и последствия заболевания, является синдром эндогенной интоксикации (СЭИ). СЭИ, формирующийся на

начальных стадиях заболевания, является сложным многокомпонентным процессом, обусловленным действием различных эндогенных продуктов [Левина Л.С., 1988; Симбирцев С.А., Беляков Н.А., 1994; Субботин А.В. 2001, 2002]. Патогенез синдрома эндогенной интоксикации определяют токсемия, тканевая гипоксия и угнетение собственных детоксицирующих и защитных систем организма, определяющие тяжесть течения и выраженность клинической симптоматики у больных КЭ [Симбирцев С.А., Беляков Н.А., 1994; Марусанов В.Е. и соавт., 1995]. Клиническую манифестацию заболевания обуславливает накопление эндогенных токсинов в органах и тканях с гиперэргической воспалительной реакцией. Возникновение тканевой гипоксии, изменение механизмов гомеостаза ведут к угнетению органов и систем естественной детоксикации, развитию недостаточной экскреторной и синтетической функции печени, почек и легких; развивается вторичная иммунологическая недостаточность, угнетение систем естественной резистентности и антиоксидантной защиты [Шаповал А.И., 1980; Марусанов В.Е. и соавт., 1995; Иерусалимский А.П., 2001; Субботин А.В. 2001]. Терминальная стадия СЭИ характеризуется системными нарушениями тканевого метаболизма, развитием полиорганной недостаточности, которая и определяет исход заболевания [Марусанов, 1995; Субботин А.В., 2001].

Персистенция вируса в организме зависит от ряда факторов: патогенности и вирулентности штамма возбудителя болезни; естественной резистентности макроорганизма; реакций иммунной системы в целом и наличия иммунопатологических реакций в частности; способности вирусов влиять на индукцию иммунного ответа и подавлять его реализацию; особенностей ткани ЦНС, в частности нейронов с их отсутствием способности к делению [Шаповал А.И., 1980; Погодина В.В., 1986; Смородинцев А.А., Дубов А.В., 1986; Антонов П.В., Цинзерлинг В.А., 2001; Иерусалимский А.П., 2001]

Таким образом, имеющаяся информация по патогенезу клещевого энцефалита допускает обоснованность предположения о том, что в инфицированной клетке параллельно с процессами репликативной инфекции также могут протекать процессы персистентной вирусной инфекции. Если при остром клещевом энцефалите процессы репликативной и персистентной инфекции часто могут быть совме-

щны, то прогрессивная и, в особенности, хроническая инфекция, по-видимому, поддерживаются преимущественно за счет процессов вирусной персистенции.

Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материал исследования

2.1.1. Общая характеристика больных

Обследовано 98 человек, больных клещевым энцефалитом (КЭ) и инфекцией-микст (иксодовым клещевым боррелиозом в сочетании с клещевым энцефалитом). Пациенты находились на стационарном лечении в инфекционной клинике СГМУ (зав. каф. – д.м.н., проф. А.В. Лепехин, зав. клиникой – к.м.н., доцент Н.С. Бужак), инфекционном отделении 3-ей городской больницы (гл. врач - к.м.н. А.А. Орешин, зав. отд. – Г.В. Западаева) и медико-санитарной части “Строитель” (гл. врач – В.Г. Козлов, зав. отд. – О.В. Буров).

Среди обследованных лиц пациенты зрелого возраста составили 68,8%, в возрасте от 18 до 30 лет - 15,3% и в возрасте 61 - 65 лет – 15,9%. Доля мужчин и женщин в группе обследованных лиц до 30 лет была практически равной, в группах старше 30 лет преобладали мужчины.

Анализ эпидемиологических данных показал, что факты присасывания клещей регистрировались на приусадебных участках и при посещении лесных массивов пригородных зон. Период фиксации клещей на кожных покровах составлял от нескольких часов до 2-х суток. Часть пациентов самостоятельно обращалась на пункты серодиагностики и серопротекции клещевых нейроинфекций г. Томска. Незначительное количество лиц, подвергшихся нападению клещей, госпитализировались в специализированные стационары города при манифестации клинических симптомов заболевания без предварительной лабораторной диагностики сыворотки и/или клещей. Инкубационный период составлял от 5 до 23 суток. Лабораторное обследование больных, находившихся на стационарном лечении, производилось на базе НПО “Вирион” и объединения “Здоровье”.

Плановую противоклещевую вакцинацию с последней ревакцинацией в 1998 году проходили 11,9% обследованных лиц. 74,8% пациентам, обращавшимся на пункты серопротекции и серодиагностики клещевых нейроинфекций, производилась экстренная иммуно- и антибиотикопротекция.

Терапия больных КЭ включала применение противоклещевого иммуноглобулина, дезинтоксикационных и дегидратационных средств, препаратов,

улучшающих метаболические процессы в головном мозге, витаминов, симптоматических средств (седативные, жаропонижающие, антигипертензивные препараты, анальгетики и др.). Этиотропное лечение ИКБ заключалось в применении противомикробных препаратов (антибиотики из групп пенициллинов, тетрациклинов, цефалоспоринов III и IV поколения). Из патогенетических средств назначались нестероидные противовоспалительные и десенсебилизирующие лекарственные препараты, анальгетики. В период реконвалесценции использовались общеукрепляющие средства, адаптогены, витамины группы B и C, физиопроцедуры.

2.1.2. Краткая клиническая характеристика больных клещевым энцефалитом и инфекцией-микст

Все пациенты, страдающие клещевым энцефалитом (шифр А 84.0 по МКБ 10), объединялись в группы на основании клинической классификации Н.Г. Жуковой и соавт. [2000] и медико-экономических стандартов [2002].

1. Пациенты, страдающие клещевым энцефалитом лихорадочной формы, легкой и средней степеней тяжести, циклическим и рецидивирующим течением. Основными проявлениями патологии у пациентов данной группы были лихорадка 38° - 39° С продолжительностью до 7 дней, головная боль, головокружение, общая слабость, повышенная потливость, тошнота, мышечные и суставные боли. У некоторых больных (9,8%) наблюдались явления менингизма без изменений цитологического состава цереброспинальной жидкости. Серологическое обследование выявляло нарастающие титры специфических антител в парных сыворотках. У подавляющего большинства больных выявлялась острая антигенемия вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) (табл.1).

2. Пациенты, страдающие клещевым энцефалитом стертой формы, рецидивирующим течением. Особенностью клинической картины при развитии стертых форм клещевого энцефалита явилась регистрация общеинфекционных симптомов (головные и мышечные боли, общая слабость, недомогание, снижение трудоспособности и др.) при отсутствии гипертермии. Доминирующими были нарушения со стороны вегетативной нервной системы в

Таблица 1

Результаты серологического и молекулярно-генетического обследования больных клещевым энцефалитом и инфекцией-микст

Группы обследованных	IgM 1:40 – 1:160		IgG 1:100 – 1:800		IgG 1:400 - 1: 1600		Антигены ВКЭ и суммарные антитела к боррелиям						РНК ВКЭ		ДНК боррелий		К ол-во
	ИФА						НРИФ		ИФА		РНГА		ПЦР		ПЦР		
	А		А		А		А		А		А		А		А		
	бс.	%	бс.	%	бс.	%	бс.	%	бс.	%	бс.	%	бс.	%	бс.	%	бс.
Больные лихорадочной формой КЭ	11	26,8	18	43,9	23	56,1	-	-	34	82,9	21	51,2	16	39,0	-	-	41
Больные стертой формой КЭ	9	47,4	19	100	-	-	-	-	19	100	13	68,4	7	36,8	-	-	19
Больные субклинической формой КЭ	-	-	14	100	-	-	-	-	9	64,3	-	-	12	85,7	-	-	14
Больные хроническим КЭ	-	-	12	100	-	-	-	-	3	25,0	6	50,0	7	58,3	-	-	12
Больные инфекцией-микст	-	-	-	-	1	9	1	1	9	7	9	7	2	1	-	-	1
					1	1,7	2	00,0		5,0		5,0	2	6,7			2

Примечание. В заголовках столбцов приведены нарастающие титры антител к вирусу клещевого энцефалита и боррелиям. КЭ – клещевой энцефалит, ВКЭ – вирус клещевого энцефалита, ИФА – иммуноферментный анализ, НРИФ – реакция непрямой иммунофлюоресценции, РНГА – реакция непрямой гемагглютинации, ПЦР – полимеразная цепная реакция, Абс. – абсолютные значения, % - относительные значения.

виде дистального гипергидроза, стойкого красного дермографизма, общей потливости, лабильности артериального давления – у 63,2% лиц. У 36,8% пациентов обнаруживалась рассеянная неврологическая симптоматика, указывающая на минимальное вовлечение в патологический процесс вещества головного или спинного мозга. Отличительной чертой этой формы патологии служило выявление антигена в крови у 100% больных.

3. Пациенты, страдающие субклинической формой клещевого энцефалита (хроническое персистентное вирусоносительство), у которых отсутствовала манифестация клинических симптомов, однако в крови обнаруживались РНК и антиген ВКЭ (табл. 1).

4. Пациенты, страдающие хроническим клещевым энцефалитом, полиомиелитической формы, рецидивирующим течением (табл. 1). Клиническая история пациентов продолжалась от 8 до 31 месяца после стационарного лечения острого клещевого энцефалита, преимущественно лихорадочной формы. Ретроспективный анализ выявил появление новой неврологической симптоматики через 6 – 9 месяцев после манифестации острых форм заболевания. У больных регистрировались парезы мышц шеи, плечевого пояса, при этом сухожильные и периостальные рефлексы с ног были повышенными. В зоне пораженных мышц выявлялось снижение болевой чувствительности. У 33,3% пациентов обнаруживались амиотрофии, протекающие со снижением или полной утратой рефлексов. У 75% лиц была выявлена нейросенсорная тугоухость, 50% обследованных страдали вегетативными кризами.

5. Пациенты, страдающие инфекцией-микст: хроническим рецидивирующим иксодовым клещевым боррелиозом с преимущественным поражением нервной системы и опорно-двигательного аппарата, в стадии компенсации в сочетании с лихорадочной формой клещевого энцефалита, легкой и средней степеней тяжести.

Контрольную группу составляли 47 практически здоровых доноров сопоставимого с пациентами пола и возраста. Обязательным условием было отсутствие у обследованных лиц аллергических заболеваний, острого или хронического инфекционного процесса. Заболевания острыми респираторными и вирусными инфекциями отмечались в анамнезе не чаще трех раз в год.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Выделение моноцитов из периферической крови [Гольдберг Е.Д. и соавт., 1992]

Принцип метода. Выделение мононуклеаров основано на разделении популяций клеток крови в градиенте плотности и способности моноцитов прилипать к пластику.

В качестве градиента плотности ($1,077 \text{ г/см}^3$) использовали фикоλλ-урографин (ДиаэМ, Швейцария). Кровь брали из локтевой вены утром натощак, стабилизировали гепарином (25 Ед/мл) и отстаивали в течение 30 – 40 минут. Затем кровь смешивали с раствором Хенкса в пропорции 1:1. Разведенную кровь пастеровской пипеткой наслаивали на градиент плотности в отношении 2:1, центрифугировали в течение 7 минут при 3000 об/мин. Образовавшееся мононуклеарное кольцо осторожно через верхний слой плазмы отсасывали пастеровской пипеткой, переносили в пробирку и трижды отмывали от фикоλλ-урографина средой 199, центрифугируя в течение 10 минут при 1500 об/мин. Надосадочную жидкость сливали. Оставшийся осадок, содержащий моноциты и лимфоциты, ресуспендировали в среде 199.

Для разделения лимфоцитов и моноцитов взвесь выделенных мононуклеаров переносили в пластиковую чашку Петри с диаметром 20 мм с помещенным на ее дно покровным стеклом. Инкубировали в термостате 40 минут при температуре 37°C . За это время моноциты, обладающие способностью прилипать к пластику и стеклу, адсорбировались на дне чашки Петри и покровном стекле. Промывали покровные стекла в растворе Хенкса.

2.2.2. Определение фагоцитарной активности моноцитов крови [Михеенко Т.В., 1990]

Принцип метода. Метод основан на измерении оптической плотности лизирующего раствора, содержащего разрушенные фагоциты, поглотившие частицы нейтрального красного.

Для определения фагоцитарной активности моноцитов периферической крови концентрацию выделенных из крови мононуклеаров (см. 2.2.1) довели средой 199 с 2% ЭТС до $1,5 \times 10^6/\text{мл}$ и инкубировали при 37°C в течение 2 часов.

После инкубации надосадок, содержащий неприлипшие клетки сливали, а фиксированный на пластике клеточный монослой дважды отмывали средой 199. В слегка подсушенную чашку вносили 2 мл 0,1% раствора нейтрального красного и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Затем раствор красителя сливали, клеточный монослой промывали средой 199. В чашку вносили 3 мл лизирующего раствора (26 мл 0,15 М цитратно-фосфатного буфера, рН=4,2, 74 мл 96° этанола), содержимое чашки перемешивали вращением и сливали в чистую пробирку.

Измерение оптической плотности лизирующего раствора, содержащего разрушенные фагоциты, поглотившие частицы нейтрального красного, проводили с помощью спектрофотометра СЭФ-4 при $\lambda=540$ нм. Результаты выражали в условных единицах оптической плотности.

2.2.3. Определение экспрессии рецепторов моноцитов

2.2.3.1. Определение количества $C3\beta^+$ -моноцитов/макрофагов периферической крови [Фрейдлин И.С., 1984]

Определение количества $C3\beta^+$ -моноцитов/макрофагов проводили в культуре моноцитов периферической крови с использованием эритроцитов барана, нагруженных гемолитическими АТ и комплементом мыши (ЕАС-комплекс). Концентрацию выделенных из крови мононуклеаров (см. 2.2.1) доводили средой 199 с 2% ЭТС до $1,5 \times 10^6$ /мл и инкубировали при 37°C в течение 2 часов. Затем стекла извлекали, осторожно промывали и переносили в чашки Петри. На покровные стекла с прилипшими моноцитами наносили по 1 капле ЕАС-комплекса и инкубировали 15 минут при 37°C. После инкубации готовили препараты “раздавленной капли” и исследовали моноциты-макрофаги, отмечая среди них розеткообразующие клетки (%).

2.2.3.2. Определение количества $Fc\gamma^+$ -моноцитов/макрофагов периферической крови [Земсков В.М. и соавт., 1985]

Определение $Fc\gamma$ -рецепторов моноцитов-макрофагов проводили методом ЕА-розеткообразования (ЕА-комплекс – эритроциты барана, сенсibilизированные кроличьей сывороткой против эритроцитов барана) в культуре моноцитов периферической крови. Посев культур и культивирование моноцитов проводили

описанным методом (см. 2.2.3.1). На покровные стекла с прикрепившимися клетками наносили по 1 капле ЕА-комплекса и инкубировали при 4°С в течение 2 часов. После инкубации готовили препараты “раздавленной капли” и исследовали моноциты/макрофаги, отмечая среди них розеткообразующие клетки (%).

2.2.4. Исследование секреторных способностей мононуклеарных клеток периферической крови

2.2.4.1. Культивирование мононуклеарных лейкоцитов периферической крови [Хайтов Р.М. и соавт., 1995]

Выделение мононуклеарных лейкоцитов периферической крови. Венозную гепаринизированную кровь (25 ЕД/мл) выдерживали при 37°С в течение 40-60 минут для отделения плазмы и эритроцитов. Полученную плазму наслаивали на градиент плотности фиколл-урографин ($\rho=1,077 \text{ г/см}^3$) в соотношении 1:1 и центрифугировали при 1500 об/мин 20 минут. Образовавшееся кольцо из смеси мононуклеарных клеток собирали пастеровской пипеткой с раздела фаз, трижды отмывали средой RPMI-1640, последовательно ресуспендируя и центрифугируя каждый раз в течение 10 минут при 1500 об/мин.

Приготовление супернатантов. Для получения супернатантов выделенные мононуклеарные лейкоциты ресуспендировали в полной питательной среде, состоящей из 90% RPMI-1640, 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (“Sigma”, USA), 0,3 мг/мл L-глутамина, 100 мкг/мл гентамицина, 2мМ/мл NEPES (“Flow”, GB). Стандартизировали количество клеток в суспензии до $2,5 \times 10^6$ /мл. Для стимуляции секреторных способностей мононуклеарных клеток в пробы вносили 10 мкг/мл ЛПС (LPS from E. coli 026:B6 “Sigma”, USA). Клеточные суспензии в количестве 1,5 мл инкубировали при 37°С и 5% CO₂ на протяжении 24 часов. После инкубации пробирки встряхивали, центрифугировали 10 минут при 1500 об/мин, клетки осадка исследовали на жизнеспособность. Для этого 0,1 мл суспензии смешивали с равным объемом 0,5% трипанового синего (“Serva” США), заполняли счетную камеру Горяева. Жизнеспособность мононуклеаров оценивали по содержанию “мертвых” клеток, окрашенных в синий цвет. Затем супернатант собирали и использовали для количественного определения уровней цитокинов и концентрации нитритов.

2.2.4.2. Спектрофотометрический способ определения концентрации нитритов [Green L.C. et al., 1982]

Принцип метода. Спектрофотометрическое определение нитритов в водных растворах основано на цветной реакции с реактивом Грисса.

Ход определения. Для приготовления реактива Грисса смешивали равные количества 0,1% водного раствора N-(1-нафтил)-этиленамида и 1% сульфаниламида в 5% ортофосфорной кислоте (“Sigma”, USA). Реактив и исследуемые образцы супернатантов по 0,1 мл помещали в 96-луночные круглодонные планшеты (“Costar”), на планшетном спектрофотометре измеряли абсорбцию при длине волны 550 нм. Концентрацию нитритов определяли по калибровочной кривой, построенной с использованием известных разведений нитрита натрия.

2.2.4.3. Иммуноферментный анализ для количественного определения уровней цитокинов

Для определения уровней ФНО- α , ИЛ-12 и ИФН- γ в супернатантах использовался твердофазный иммуноферментный “сэндвичевый” метод (ELISA).

Принцип метода. Концепция метода заключается в конъюгации одного эпитопа молекулы цитокина мышинными моноклональными антителами, сорбированными на твердой фазе микропланшета. Другой тип антител - кроличьи поликлональные специфичные против человеческих цитокинов. Антитела соединяются с независимым эпитопом цитокина. Избыток кроличьих антител удаляется. К сорбированным на твердой фазе комплексам цитокин-антитела добавляется окрашивающий раствор. Оптическая плотность раствора пропорциональна концентрации определяемого вещества и регистрируется колориметрически. Калибровочная кривая строится с использованием среды, не содержащей продукты жизнедеятельности клеток (“0 доза”) и стандартных растворов цитокинов с известной концентрацией.

Ход определения. Процедура выполнения ИФА проводилась по инструкции, предлагаемой производителем тест-систем (“Cytimmune”, USA). Для этого микропипеткой добавляли по 100 мкл “0 дозы” и стандартов № 0-4 для ФНО- α ,

ИЛ-12 и ИФН- γ в соответствующие ячейки. В оставшиеся ячейки помещали 100 мкл супернатанта и 25 мкл поликлональных антител и инкубировали планшет 3 часа при комнатной температуре. После двукратного цикла промывки автоматическим вошером, в каждую ячейку добавляли по 50 мкл козлиной антикроличьей щелочной фосфатазы и инкубировали 45 минут. После очередного цикла промывок в лунки вводили 200 мкл окрашивающего раствора. Когда оптическая плотность стандарта №1 достигала уровня 1,6, завершающая фаза инкубации заканчивалась добавлением в ячейки стоп-раствора (0,5 М серная кислота). Оптическую плотность плашки регистрировали на ридере ultra microplate ВЮ-ТЕС, ELX-808 (Финляндия) при длине волны 492 нм. Концентрации цитокинов вычислялись по калибровочной кривой.

2.2.5. Исследование показателя активности и поглотительной способности нейтрофильных гранулоцитов периферической крови [Меньшиков В.В., 1987]

Принцип метода. Полиморфноядерные лейкоциты периферической крови способны связывать на своей поверхности, поглощать тест-культуру (рис. 1).

Ход определения. Для постановки реакции форменные элементы крови, содержащиеся в 2 каплях гепаринизированной крови (25 Ед/мл), отмывали от плазмы раствором Хенкса, центрифугируя пробирки с кровью 10 минут при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость удаляли, осадок встряхивали и добавляли к нему 2 капли одномиллиардной взвеси суточной культуры *Staphylococcus aureus* Н-209. Полученную взвесь инкубировали в термостате 30 минут при $T = 37^{\circ}\text{C}$, встряхивая через каждые 10 минут. Для определения показателей незавершенного фагоцитоза [показатель активности нейтрофилов – ПАН (%), поглотительная способность нейтрофилов – ПСН (ед.)] через 30 минут инкубации в пробирки добавляли каплю 5% раствора формалина для останова реакции и центрифугировали 30 секунд при 3000 об/мин. Из лейкоцитарной пленки, образовавшейся на поверхности осадка, делали мазок. Мазки высушивали, фиксировали метиловым спиртом 3 – 5 минут и окрашивали азурII-эозином. В мазках подсчитывали 100 нейтрофилов, определяя процент активных клеток. Поглотительную способность нейтрофильных гранулоцитов рассчитывали по формуле (1):

$$\text{ПСН} = \frac{\text{общее число поглощенных бактерий}}{\text{количество активных нейтрофилов}} \quad (1)$$

2.2.6. Исследование показателя завершенности фагоцитоза [Меньшиков В.В., 1987]

Для определения показателя завершенности фагоцитоза к смеси клеток гепаринизированной крови и стафилококка (см. 2.2.6) добавляли по 1 капле жидкой питательной среды (мясо-пептонный бульон) и продолжали инкубацию еще 1 час при постоянном встряхивании. По прошествии времени инкубации в пробирки добавляли формалин, центрифугировали. Мазки готовили и окрашивали как в случае незавершенного фагоцитоза.

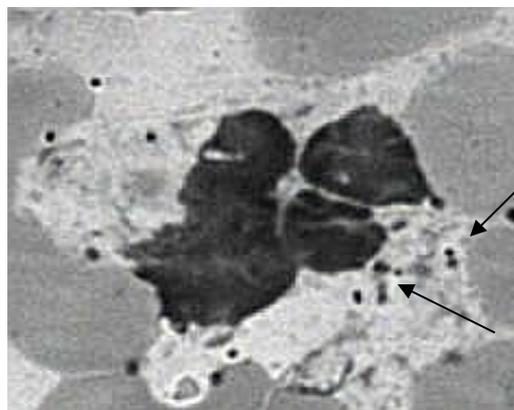


Рис. 1. Микрофотография нейтрофилов периферической крови. В цитоплазме поглощенные бактерии. Световая микроскопия. Увеличение 900. Окраска азурII-эозином.

В мазках просчитывали 100 активных нейтрофилов, где учитывали общее число поглощенных стафилококков и число поврежденных стафилококков на каждый активный нейтрофил.

Показатель завершенность фагоцитоза вычисляли по формуле (2):

$$\text{ПЗФ} = \frac{\text{общее число поврежденных бактерий}}{\text{общее количество поглощенных бактерий}} \times 100\% \quad (2)$$

2.2.7. Тест восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест) [Davis S., 1970; Климов В.В., Кошовкина Т.В., 1982]

Принцип метода. Оценка фагоцитирующей активности нейтрофилов периферической крови в НСТ-тесте основана на поглощении гранулоцитами нитросинего тетразолия и бессубстратном восстановлении его активными формами кислорода в формазан, выявляемый в виде отложений грубо-дисперсных гранул темно-синего цвета внутри или на поверхности клеток. Нарушение способности к восстановлению нитросинего тетразолия коррелирует с патологией кислородзависимых механизмов бактерицидности.

Ход определения. К 0,075 мл крови, стабилизированной гепарином (50 Ед/мл), добавляли 0,025 мл НСТ и инкубировали полученную взвесь в термостате (37°C, 30 минут). Готовили толстые мазки, сушили на воздухе, фиксировали в метаноле 3 минуты. Мазки окрашивали 10 минут 0,5% раствором сафранина на 0,025 М

растворе буры, докрашивали 1 минуту 1% спиртовым раствором бриллиантового зеленого. При микроскопии подсчитывали процент активных нейтрофилов, содержащих темно-синие гранулы диформаза.

2.2.8. Приготовление лейкоконцентрата венозной крови [Меньшиков В.В., 1987]

Принцип метода. В связи с различным удельным весом эритроцитов и лейкоцитов и добавлением трилона Б, ускоряющего осаждение эритроцитов, получают плазму, содержащую большое количество лейкоцитов.

Ход определения. В пробирку с 1 мл 3% раствора трилона Б вносили 4 мл венозной крови, перемешивали. Ставили смесь в термостат на 30-45 минут. Затем отсасывали слой плазмы в центрифужную пробирку и центрифугировали при 1000 об/мин 10 минут. Надосадочную жидкость удаляли, а из осадка готовили мазки. Мазки высушивали, фиксировали и окрашивали гематологическими красителями.

2.2.9. Цитохимические методы исследования лейкоцитов

2.2.9.1. Определение содержания гликогена по McManus (ШИК-реакция) [Хэйхоу Дж. Ф.Г., Кваглино Д., 1983]

Принцип метода. Под влиянием йодной кислоты гликоген окисляется с образованием альдегидных соединений, легко реагирующих с реактивом Шиффа (рис. 2).

Ход определения. Мазки, приготовленные из лейкоконцентрата венозной крови (см. 2.2.8), фиксировали в парах формалина в течение 10 мин, высушивали на воздухе и выдерживали 5 мин в 0,5% растворе йодной кислоты, после чего промывали в трех порциях дистиллированной воды (по 3 мин в каждой). Высушенные мазки помещали

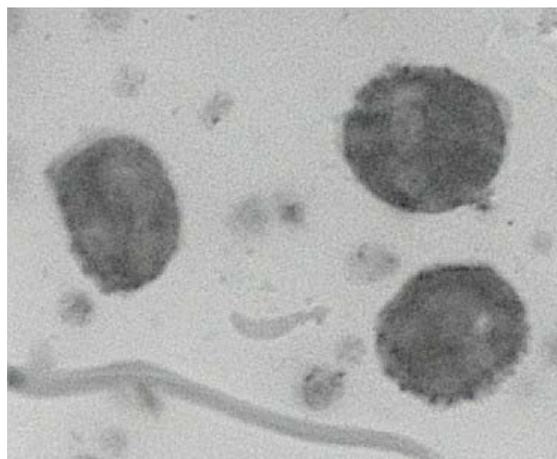


Рис. 2. Микрофотография лейкоцитов периферической крови. В цитоплазме гранулы гликогена (3+). Световая микроскопия. Увеличение 900.

на 30 мин в реактив Шиффа (200 мл 0,5% раствора основного фуксина, 1 г метабисульфита калия, 20 мл 1 Н раствора HCl, pH 2,0), промывали в трех порциях сернистой воды (10% раствор метабисульфита калия, 1Н раствор HCl, дистиллированная вода – 1:1:20) по 3 мин в каждой и 10 мин в проточной воде, высушивали и докрашивали гематоксилином 10мин. Промывали проточной водой и высушивали.

В зависимости от визуально определяемой степени интенсивности окраски клетки делили на 4 группы (рис. 1): 0 – окрашивание отсутствует, 1(+) – слабое окрашивание, 2(++), – умеренное окрашивание, 3(+++) – интенсивное окрашивание.

Средний цитохимический коэффициент (СЦК) рассчитывали по формуле (3):

$$\text{СЦК} = \frac{3а + 2б + 1в + 0г}{\text{количество обследованных клеток}} \quad (3)$$

где 0, 1, 2, 3 – номер группы; а, б, в, г – количество положительно реагирующих клеток каждой группы.

2.2.9.2. Определение содержания липидов по Sheehan, Storey [Хэйхоу Дж. Ф. Г., Кваглино Д., 1983]

Принцип метода. Способность липофильных красителей растворяться и избирательно концентрироваться во внутриклеточных липидах (рис. 3).

Ход определения. Мазки, приготовленные из лейкоконцентрата венозной крови (см. 2.2.8), фиксировали в парах формалина в течении 1 мин, высушивали на воздухе и помещали на 60 мин в раствор судана черного Б следующего состава: 60 мл 0,35% раствора судана черного Б (на абсолютном этиловом спирте), 40 мл буферной смеси (16 г фенола растворяли в 30 мл абсолютного этилового спирта и добавляли к 100 мл дистиллированной воды, содержащей 0,3 г

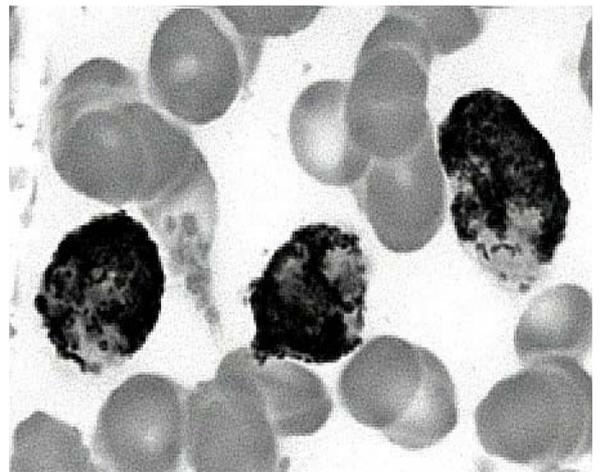


Рис. 3. Микрофотография лейкоцитов периферической крови. В цитоплазме зернистость липидов (3+). Световая микроскопия. Увеличение 900.

гидрофосфата $\text{Na}_x12 \text{H}_2\text{O}$). Окрашенные препараты ополаскивали 1-2 мин в 70% спирте и промывали проточной водой. Высушенные мазки дополнительно окрашивали азурII-эозином в течение 10 минут. Результаты реакции оценивали, рассчитывая СЦК (см. 2.2.9.1).

2.2.9.3. Определение ферментативной активности щелочной фосфатазы по методу Т.В. Михеева [Меньшиков В.В., 1987]

Принцип метода. При ферментативном гидролизе нафтол-ASMХ-фосфата высвобождается нафтол, который при взаимодействии с солями диазония образует окрашенные гранулы (рис. 4).

Ход определения. Мазки, приготовленные из лейкоконцентрата венозной крови (см. 2.2.8), фиксировали в парах формалина в течение 30 секунд. Затем мазки помещали в специально приготовленную инкубационную смесь (10 мл 0,004% раствора нафтол-ASMХ-фосфата (20 мг ASMХ, 2 мл ацетона, 500мл дистиллированной воды); 0,5 мл трис буфера pH 8,5; 0,2 мл 11,9% раствора сульфата магния; 10 мг

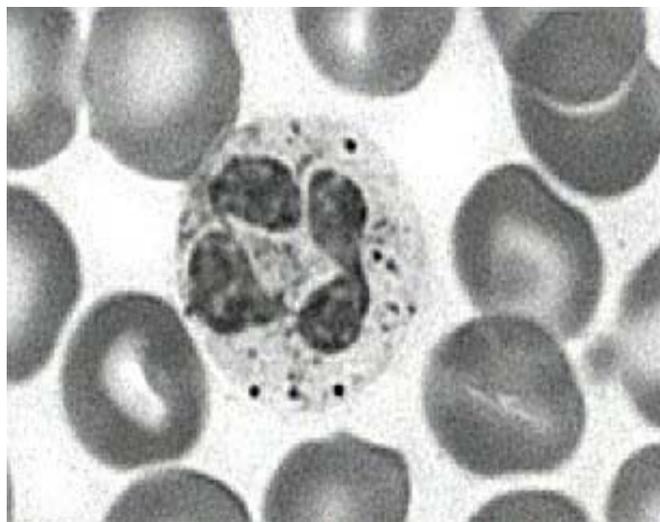


Рис. 4. Микрофотография нейтрофилов периферической крови. В цитоплазме гранулы щелочной фосфатазы. Световая микроскопия. Увеличение 900.

гранатового прочного) на 30 мин при 37°C, высушивали. Докрашивали азуром II в течение 3-5 мин, промывали проточной водой, высушивали. Результаты реакции оценивали, рассчитывая СЦК (см. 2.2.9.1).

2.2.9.4. Определение содержания неферментного катионного белка по методу М. Г. Шубича [Меньшиков В.В., 1987]

Принцип метода. Избирательная окраска катионных белков бромфеноловым синим.

Ход определения. Мазки, приготовленные из лейкоконцентрата венозной

крови (см. 2.2.8), фиксировали в 5% растворе сульфосалициловой кислоты в течение 60-90 секунд. Промывали дистиллированной водой и высушивали. Окрашивали 0,1% раствором бромфенолового синего в боратном буфере (100 мг бромфенолового синего растворяли в 100 мл 0,05 М боратного буфера рН 8,2). Промывали в трех сменах 0,05 М боратного буфера (к 6,13 мл 0,05 М раствор буры рН 9,55 добавляли 3,87 мл 0,1 М раствора однозамещенного фосфата калия) по 1-3 минуты. Высушивали и докрасивали 1% раствором сафранина в течение 30-60 секунд. Промывали проточной водой и высушивали. Результаты реакции оценивали, рассчитывая СЦК (см. 2.2.9.1).

2.2.9.5. Определение активности неспецифической эстеразы по Науное, Quaglinо [Хэйхоу Дж.Ф.Г., Кваглино Д., 1983]

Принцип метода. Соединение α -нафтилацетата при определенных рН и температуре под влиянием неспецифических эстераз гидролизуеться с образованием нафтола, который с солями диазония дает цветное окрашивание (рис. 5).

Ход определения. Мазки, приготовленные из лейкоконцентрата венозной крови (см. 2.2.8), фиксировали в парах формалина в течение 5 минут. Затем инкубировали 2 ч при 37°C в среде следующего состава: 1 мл 1% раствора нафтилацетата (5 мл ацетона, 5 мл дистиллированной воды, 100 мг нафтилацетата), 25 мг синего прочного ВВ, 5 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 8,8), 50 мл дистиллированной воды (фильтровали). После инкубации мазки промывали проточной водой, высушивали и докрасивали азуром II в течение 10 мин. Результаты реакции оценивали, рассчитывая СЦК (см. 2.2.9.1).

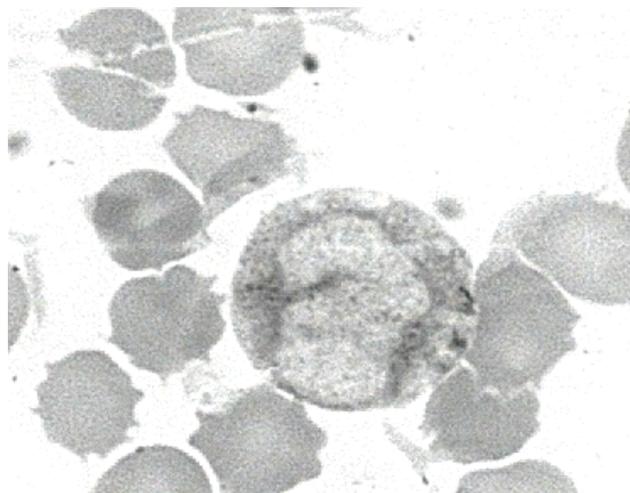


Рис. 5. Микрофотография моноцитов периферической крови. В цитоплазме гранулы неспецифической эстеразы. Световая микроскопия. Увеличение 900.

2.2.9.6. Определение ферментативной активности кислой фосфатазы по Goldberg, Varca [Хэйхоу Дж. Ф. Г., Кваглино Д., 1983]

Принцип метода. Под действием кислой фосфатазы происходит расщепление нафтола-AS-фосфата с образованием продукта, дающего при взаимодействии с солями диазония красную окраску.

Ход определения. Мазки, приготовленные из лейкоконцентрата венозной крови (см. 2.2.8), фиксировали в парах формалина 30 секунд. Затем инкубировали 2 часа при 37° С в среде следующего состава: 20 мг нафтол-AS-фосфата; 0,5 мл диметилформамида; 40 мл 0,1% раствора ацетата натрия; 8 капель 4% парарозанилина (1 г фуксина растворяли в 25 мл 2N HCl); 8 капель 4% азотистого Na (отфильтровывали до соломенно-желтого цвета). После инкубации мазки промывали проточной водой 5-10 мин, высушивали и докрашивали 0,1% раствором азура II в течение 10 минут. Результаты реакции оценивали, рассчитывая СЦК (см. 2.2.9.1).

2.2.9.7. Определение ферментативной активности миелопероксидазы по Graham-Knoll [Меньшиков В.В., 1987]

Принцип метода. В присутствии пероксидазы бензидин окисляется перекисью водорода в оксибензидин, имеющий коричневую окраску.

Ход определения. Свежие мазки лейкоконцентрата (см. 2.2.8) фиксировали 4% формалиново-спиртовым раствором в течение 30 секунд. Обмывали в проточной воде, высушивали. Заливали реактивом на пероксидазу на 5 минут (состав реактива: бензидин (на кончике ножа) растворяли в 6 мл 96% спирта, прибавляли 4 мл воды и 0,02 мл перекиси водорода). Мазки тщательно промывали в проточной воде и высушивали. Докрашивали азурII-эозином в течение 10 минут. Результаты реакции оценивали, рассчитывая СЦК (см. 2.2.9.1).

2.2.10. Статистическая обработка результатов

При оценке полученных данных использовали методы статистического описания и проверки статистических гипотез [Лакин Г.Ф., 1980]. Проверку нормальности распределения количественных показателей проводили с использованием критерия Колмогорова-Смирнова. Оценку различий между различными выборками проводили с использованием t-критерия Стьюдента (при

нормальном распределении переменных) и U-теста Манна-Уитни (с случае отсутствия согласия данных с нормальным распределением). Для выявления функциональных взаимосвязей между изучаемыми параметрами проводили корреляционный анализ Спирмена.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Характеристика фагоцитов периферической крови у здоровых людей

3.1.1. Функциональные особенности моноядерных лейкоцитов периферической крови у здоровых людей

Изучение функционального статуса моноцитов/макрофагов периферической крови людей, составляющих группу контроля, позволило выявить $42,56 \pm 1,36\%$ С3R-экспрессирующих $42,76 \pm 1,33\%$ FcγR-экспрессирующих моноцитов. Фагоцитарная активность мононуклеарных лейкоцитов при этом составляла $123,60 \pm 2,76$ ед. опт. плотности (табл. 2). Цитохимическое исследование моноцитов периферической крови констатировало уровень активности неспецифической эстеразы (НЭ) в пределах $0,953 \pm 0,030$, миелопероксидазы (МП) – $0,071 \pm 0,008$, содержание гликогена и липидов $1,20 \pm 0,03$ и $2,43 \pm 0,05$ соответственно (табл. 3). Базальная продукция мононуклеарными лейкоцитами оксида азота, ИЛ-12, ФНО-α и ИФН-γ определялась на уровне $6,86 \pm 0,23$ мМ/мл, $19,77 \pm 0,69$ пг/мл, $93,11 \pm 6,83$ пг/мл и $37,65 \pm 2,84$ пг/мл, стимулированная – $13,75 \pm 0,42$ мМ/мл, $29,57 \pm 2,19$ пг/мл, $230,51 \pm 19,15$ пг/мл и $74,64 \pm 5,52$ пг/мл соответственно (табл. 4). Индекс стимуляции для оксида азота составил $2,03 \pm 0,10$, для ИЛ-12 – $1,51 \pm 0,11$, для ФНО-α – $2,55 \pm 0,25$ и для ИФН-γ – $1,99 \pm 0,07$ (табл. 4).

3.1.2. Фагоцитарный статус нейтрофильных гранулоцитов у здоровых людей

В результате исследования фагоцитарного статуса полиморфноядерных лейкоцитов периферической крови у здоровых доноров оказалось, что показатель активности нейтрофилов (ПАН) соответствовал $65,52 \pm 0,86\%$, поглотительная способность нейтрофилов (ПСН) – $5,12 \pm 0,07$ ед., показатель завершенности фагоцитоза (ПЗФ) – $61,28 \pm 0,85\%$ (табл. 5). Цитохимическое исследование нейтрофильных гранулоцитов показало, что ферментативная активность щелочной фосфатазы (ЩФ) оказалась равной $2,13 \pm 0,08$, кислой фосфатазы (КФ) – $0,943 \pm 0,022$, миелопероксидазы (МП) – $1,91 \pm 0,07$. Средний цитохимический коэффициент гликогена в полиморфноядерных фагоцитах составил $2,61 \pm 0,06$, липидов – $2,79 \pm 0,04$, неферментных катионных белков (НКБ) – $2,19 \pm 0,03$ (табл. 6).

Функциональный статус моноцитов периферической крови у больных клещевым энцефалитом ($\bar{X} \pm m$)

Группы обследованных		Количество рецептор-экспрессирующих моноцитов/макрофагов (%)		Фагоцитарная активность моноцитов/макрофагов (ед. опт. плотности)
		С3 β ⁺ -клетки	Fc γ ⁺ -клетки	
Здоровые доноры (n=47)		42,56±1,36	42,76±1,33	123,60±2,76
Пациенты, страдающие лихорадочной формой клещевого энцефалита (n=41)	2 неделя	27,79±1,32 p ₁ <0,001	27,21±1,86 p ₁ <0,001	132,42±7,32
	4 неделя	25,06±1,58 p ₁ <0,001	28,12±1,51 p ₁ <0,001	130,56±5,32
Пациенты, страдающие стертой формой клещевого энцефалита (n=19)	2 неделя	24,67±1,54 p ₁ <0,001	21,67±1,83 p ₁ <0,001 p ₂ <0,05	102,89±4,53 p ₁ <0,01 p ₂ <0,05
	4 неделя	32,56±1,77 p ₁ <0,01 p ₃ <0,01 p ₄ <0,05	23,89±1,67 p ₁ <0,001	117,33±4,70
Пациенты, страдающие субклинической формой клещевого энцефалита (n=14)		54,31±2,25 p ₁ <0,001	50,94±4,30 p ₁ <0,05	152,37±7,76 p ₁ <0,01
Пациенты, страдающие хроническим клещевым энцефалитом (n=12)		39,42±2,61 p ₂ <0,001 p ₃ <0,01 p ₄ <0,001 p ₅ <0,001	52,32±1,32 p ₁ <0,001 p ₂ <0,001 p ₃ <0,001 p ₄ <0,001 p ₆ <0,001	89,84±3,05 p ₁ <0,001 p ₂ <0,001 p ₃ <0,05 p ₄ <0,001 p ₅ <0,001 p ₆ <0,001
Пациенты, страдающие инфекцией-микст (n=12)	2 неделя	31,00±4,21 p ₁ <0,05	38,67±6,50	81,83±7,45 p ₁ <0,001 p ₂ <0,01
	4 неделя	31,87±2,78 p ₁ <0,01	44,25±3,80 p ₄ <0,01	93,12±8,39 p ₁ <0,01 p ₄ <0,01

Примечание: здесь и далее в табл. 3, 5, 6

p₁ - достоверность различий показателей по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров;

p₂ - по сравнению с аналогичными показателями у больных с лихорадочной формой клещевого энцефалита (КЭ), обследованных на 2-й неделе заболевания;

p₃ - у больных со стертой формой КЭ, обследованных на 2-й неделе заболевания;

p₄ - у больных с лихорадочной формой КЭ, обследованных на 4-й неделе заболевания;

p₅ - у больных с субклинической формой КЭ;

p₆ - у больных со стертой формой КЭ, обследованных на 4-й неделе заболевания;

n - количество обследованных лиц.

Таблица 3

Ферментативная активность и содержание гликогена и липидов в моноцитах периферической крови у больных клещевым энцефалитом и инфекцией-микст ($\bar{X} \pm m$)

Группы обследованных		Гликоген	Липиды	Неспецифическая эстераза	Миело-пероксидаза
		Средний цитохимический коэффициент			
Здоровые доноры (n=47)		1,20±0,03	2,43±0,05	0,953±0,030	0,071±0,008
Пациенты, страдающие лихорадочной формой клещевого энцефалита (n=41)	2 неделя	0,656±0,041 p ₁ <0,001	0,707±0,043 p ₁ <0,001	1,13±0,04 p ₁ <0,001	0,101±0,026
	4 неделя	0,633±0,041 p ₁ <0,001	2,23±0,06 p ₁ <0,05 p ₂ <0,001	1,29±0,04 p ₁ <0,001 p ₂ <0,01	0,057±0,013
Пациенты, страдающие стертой формой клещевого энцефалита (n=19)	2 неделя	0,910±0,048 p ₁ <0,001 p ₂ <0,01	0,483±0,047 p ₁ <0,001 p ₂ <0,01	0,831±0,063 p ₂ <0,001	0,079±0,017
	4 неделя	0,808±0,054 p ₁ <0,001 p ₄ <0,05	0,988±0,030 p ₁ <0,001 p ₃ <0,001 p ₄ <0,001	0,317±0,044 p ₁ <0,001 p ₃ <0,001 p ₄ <0,001	0,020±0,009 p ₁ <0,01 p ₃ <0,05
Пациенты, страдающие субклинической формой клещевого энцефалита (n=14)		1,28±0,05	2,43±0,05	0,595±0,047 p ₁ <0,001	0,050±0,011
Пациенты, страдающие хроническим клещевым энцефалитом (n=12)		1,11±0,03 p ₂ <0,001 p ₃ <0,01 p ₄ <0,001 p ₅ <0,05 p ₆ <0,001	1,91±0,09 p ₁ <0,001 p ₂ <0,001 p ₃ <0,001 p ₄ <0,05 p ₅ <0,001 p ₆ <0,001	1,13±0,04 p ₁ <0,01 p ₃ <0,01 p ₄ <0,05 p ₅ <0,001 p ₆ <0,001	Не выявлено
Пациенты, страдающие инфекцией-микст (n=12)	2 неделя	0,920±0,073 p ₁ <0,01 p ₂ <0,01	2,35±0,16 p ₂ <0,001	0,363±0,052 p ₁ <0,001 p ₂ <0,001	0,033±0,015
	4 неделя	0,865±0,076 p ₁ <0,01 p ₄ <0,05	2,43±0,13	0,381±0,075 p ₁ <0,05	0,034±0,015 p ₁ <0,001 p ₄ <0,001

Продукция цитокинов и оксида азота лейкоцитами периферической крови у больных клещевым энцефалитом и инфекцией-микст ($\bar{X} \pm m$)

Исследуемые параметры		Здоровые доноры (n=10)	Пациенты, страдающие лихорадочной формой КЭ (n=10)	Пациенты, страдающие субклинической формой КЭ (n=8)	Пациенты, страдающие хроническим КЭ (n=9)	Пациенты, страдающие инфекцией-микст (n=9)
Оксид азота	Базальная продукция (мМ/мл)	6,86±0,23	4,53±0,44 p ₁ <0,01	8,04±0,75	6,08±0,56	4,97±0,75 p ₁ <0,05
	Стимулированная продукция (мМ/мл)	13,75±0,42	3,29±0,39 p ₁ <0,001	9,48±0,51 p ₁ <0,001	4,47±0,49 p ₁ <0,001 p ₃ <0,001	4,08±0,611 p ₁ <0,01
	Индекс стимуляции	2,03±0,10	0,728±0,048 p ₁ <0,001	1,23±0,09 p ₁ <0,001	0,741±0,064 p ₁ <0,001 p ₃ <0,01	0,833±0,06 p ₁ <0,01
ИЛ-12	Базальная продукция (пг/мл)	19,77±0,69	24,81±2,22	30,34±2,41 p ₁ <0,01	37,43±5,37 p ₁ <0,05	14,01±2,09 p ₁ <0,05 p ₂ <0,05
	Стимулированная продукция (пг/мл)	29,57±2,19	26,57±3,59	38,89±3,37 p ₁ <0,05	48,81±5,71 p ₁ <0,05 p ₂ <0,05	15,67±2,79 p ₁ <0,01 p ₂ <0,05
	Индекс стимуляции	1,51±0,11	1,06±0,08 p ₁ <0,05	1,31±0,13	1,38±0,11 p ₂ <0,05	1,16±0,17
ФНО-α	Базальная продукция (пг/мл)	93,11±6,83	136,36±11,17 p ₁ <0,01	91,37±4,21	107,29±8,43	81,66±8,41 p ₂ <0,01
	Стимулированная продукция (пг/мл)	230,51±19,15	232,80±25,22	97,25±5,41 p ₁ <0,01	122,04±6,86 p ₁ <0,01 p ₂ <0,01 p ₃ <0,05	133,67±9,61 p ₁ <0,01 p ₂ <0,01
	Индекс стимуляции	2,55±0,25	1,71±0,12 p ₁ <0,05	1,06±0,02 p ₁ <0,01	1,15±0,06 p ₁ <0,01 p ₂ <0,01	1,72±0,22
ИФН-γ	Базальная продукция (пг/мл)	37,65±2,84	80,34±8,67 p ₁ <0,01	28,90±2,72	50,11±2,84 p ₁ <0,05 p ₂ <0,01 p ₃ <0,01	40,85±5,52 p ₂ <0,05
	Стимулированная продукция (пг/мл)	74,64±5,52	232,86±26,04 p ₁ <0,01	29,90±2,92 p ₁ <0,01	60,51±4,94 p ₁ <0,05 p ₂ <0,01 p ₃ <0,01	64,40±3,44 p ₂ <0,01
	Индекс стимуляции	1,99±0,07	2,82±0,21 p ₁ <0,01	1,03±0,04 p ₁ <0,01	1,22±0,11 p ₁ <0,01 p ₂ <0,01	1,66±0,13 p ₁ <0,05 p ₂ <0,01

Примечание:

КЭ - клещевой энцефалит;

p₁ - достоверность различий показателей по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров;

p₂ - у больных с лихорадочной формой КЭ;

p₃ - у больных с субклинической формой КЭ;

n - количество обследованных лиц.

Фагоцитарная активность нейтрофильных гранулоцитов периферической крови у больных клещевым энцефалитом и инфекцией-микст ($\bar{X} \pm m$)

Группы обследованных	Фагоцитарная активность нейтрофильных гранулоцитов			Тест восстановления нитросинего тетразолия (%)	
	Показатель активности (%)	Поглотительная способность (ед.)	Показатель завершенности фагоцитоза (%)		
Здоровые доноры (n=47)	65,52±0,86	5,12±0,07	61,28±0,85	21,80±1,89	
Пациенты, страдающие лихорадочной формой клещевого энцефалита (n=41)	2 неделя	62,68±2,14	5,49±0,35	61,93±0,79	35,92±2,51 p ₁ <0,001
	4 неделя	64,44±1,63	5,10±0,31	71,79±1,87 p ₁ <0,001 p ₂ <0,001	31,25±1,45 p ₁ <0,01
Пациенты, страдающие стертой формой клещевого энцефалита (n=19)	2 неделя	63,33±2,96	4,71±0,25	57,44±1,81 p ₂ <0,05	34,89±2,29 p ₁ <0,01
	4 неделя	56,33±2,42 p ₁ <0,01 p ₄ <0,05	4,11±0,37 p ₁ <0,01 p ₄ <0,05	65,00±2,25 p ₃ <0,05 p ₄ <0,05	29,00±2,09 p ₁ <0,05
Пациенты, страдающие субклинической формой клещевого энцефалита (n=14)		62,12±2,69	6,54±0,22 p ₁ <0,001	63,94±2,01	43,31±2,02 p ₁ <0,001
Пациенты, страдающие хроническим клещевым энцефалитом (n=12)		55,16±2,29 p ₁ <0,001 p ₂ <0,05 p ₄ <0,01	6,95±0,45 p ₁ <0,001 p ₂ <0,05 p ₃ <0,01 p ₄ <0,01 p ₆ <0,001	67,16±1,31 p ₁ <0,001 p ₂ <0,01 p ₃ <0,01	51,74±1,18 p ₁ <0,001 p ₂ <0,001 p ₃ <0,001 p ₄ <0,001 p ₅ <0,01 p ₆ <0,001
Пациенты, страдающие инфекцией-микст (n=12)	2 неделя	56,83±5,16 p ₁ <0,05	7,62±0,69 p ₁ <0,01 p ₂ <0,05	64,67±5,65	39,83±2,94 p ₁ <0,01
	4 неделя	62,12±3,23	5,42±0,48 p ₇ <0,05	66,12±4,18	34,00±4,10 p ₁ <0,05

Ферментативная активность и содержание гликогена и липидов в нейтрофильных гранулоцитах периферической крови у больных клещевым энцефалитом и инфекцией-микст ($\bar{X} \pm m$)

Группы обследованных		Щелочная фосфатаза	Кислая фосфатаза	Миело-пероксидаза	Гликоген	Липиды	Неферментные катионные белки
		Средний цитохимический коэффициент					
Здоровые доноры (n=47)		2,13±0,08	0,943±0,022	1,91±0,07	2,61±0,06	2,79±0,04	2,19±0,03
Пациенты, страдающие лихорадочной формой клещевого энцефалита (n=41)	2 неделя	1,17±0,08 p ₁ <0,001	1,17±0,59 p ₁ <0,05	1,47±0,10 p ₁ <0,001	2,24±0,07 p ₁ <0,001	2,84±0,03	1,66±0,09 p ₁ <0,001
	4 неделя	0,331±0,061 p ₁ <0,001 p ₂ <0,001	0,981±0,023	1,71±0,11	2,26±0,06 p ₁ <0,001	2,36±0,06 p ₁ <0,001 p ₂ <0,001	1,59±0,10 p ₁ <0,001
Пациенты, страдающие стертой формой клещевого энцефалита (n=19)	2 неделя	0,898±0,044 p ₁ <0,001	1,06±0,03 p ₁ <0,05	2,25±0,07 p ₁ <0,01 p ₂ <0,001	2,17±0,05 p ₁ <0,01	1,94±0,06 p ₁ <0,001 p ₂ <0,001	1,86±0,07 p ₁ <0,001
	4 неделя	1,86±0,05 p ₁ <0,05 p ₃ <0,001 p ₄ <0,001	1,05±0,03 p ₁ <0,05	0,977±0,039 p ₁ <0,001 p ₃ <0,001 p ₄ <0,01	2,67±0,05 p ₃ <0,001 p ₄ <0,001	2,90±0,06 p ₃ <0,001 p ₄ <0,001	1,83±0,07 p ₁ <0,001
Пациенты, страдающие субклинической формой клещевого энцефалита (n=14)		1,71±0,15 p ₁ <0,01	0,713±0,059 p ₁ <0,001	1,80±0,06	2,78±0,03	2,66±0,05	1,99±0,03 p ₁ <0,001
Пациенты, страдающие хроническим клещевым энцефалитом (n=12)		1,47±0,08 p ₁ <0,001 p ₂ <0,05 p ₃ <0,001 p ₄ <0,001 p ₆ <0,01	1,15±0,06 p ₁ <0,05 p ₅ <0,001	1,69±0,07 p ₃ <0,001 p ₆ <0,001	2,62±0,04 p ₂ <0,001 p ₃ <0,001 p ₄ <0,001 p ₅ <0,05	2,71±0,05 p ₂ <0,05 p ₃ <0,001 p ₄ <0,001 p ₆ <0,05	1,95±0,08 p ₁ <0,05 p ₂ <0,05 p ₄ <0,01
Пациенты, страдающие инфекцией-микст (n=12)	2 неделя	0,713±0,059 p ₁ <0,001 p ₂ <0,001	1,67±0,08 p ₁ <0,001 p ₂ <0,01	1,84±0,09	2,46±0,25	2,71±0,11	2,25±0,11 p ₂ <0,01
	4 неделя	0,580±0,037 p ₁ <0,001 p ₄ <0,05	1,49±0,16 p ₁ <0,01 p ₄ <0,05	2,08±0,12	2,55±0,14	2,79±0,09 p ₄ <0,01	2,05±0,12 p ₄ <0,05

Процент клеток, содержащих гранулы диформаза, определялся на уровне $21,80 \pm 1,89$ % (табл. 5). При проведении корреляционного анализа были выявлены положительные корреляционные связи между количеством $Fc\gamma^+R$ -моноцитов и продукцией ИФН- γ ($r=0,78$, $p<0,05$), СЦК гликогена в моноцитах ($r=0,63$, $p<0,05$), продукцией ФНО- α и ПАН ($r=0,56$, $p<0,05$), уровнем макрофагального фагоцитоза ($r=0,60$, $p<0,05$), продукцией оксида азота и ИЛ-12 ($r=0,85$, $p<0,05$), отрицательные – между количеством $C3\beta$ -экспрессирующих моноцитов и продукцией ИФН- γ ($r=-0,67$, $p<0,05$).

3.2. Характеристика фагоцитов периферической крови у больных клещевым энцефалитом

3.2.1. Функциональные особенности моноядерных лейкоцитов периферической крови у больных лихорадочной формой клещевого энцефалита

Результаты, полученные при исследовании рецепторного аппарата моноцитов/макрофагов периферической крови у больных клещевым энцефалитом ЛФ на 2-ой неделе заболевания, позволили выявить статистически значимое ($p_1<0,001$) по отношению к аналогичным показателям у здоровых доноров снижение экспрессии на поверхности моноцитов как $C3\beta$ -рецепторов ($27,79 \pm 1,32\%$), так и $Fc\gamma$ -рецепторов ($27,21 \pm 1,86\%$). К 4-ой неделе заболевания нормализации экспрессии рецепторов не наблюдалось (табл. 2). Уровень фагоцитарной активности моноцитов/макрофагов периферической крови не отличался от контрольных значений и соответствовал $132,42 \pm 7,32$ ед. опт. плотности (табл. 2).

Проведенное цитохимическое исследование показало, что у больных лихорадочной формой КЭ, обследованных на 2-ой неделе заболевания, содержание гликогена и липидов оказалось сниженным (до $0,656 \pm 0,041$, $p_1<0,001$ и $0,707 \pm 0,043$, $p_1<0,001$), а активность неспецифической эстеразы - повышенной (до $1,13 \pm 0,04$, $p_1<0,001$) (табл. 3). К 4-ой неделе заболевания вышеуказанные показатели оставались достоверно отличны от аналогичных в группе здоровых доноров ($0,633 \pm 0,041$, $p_1<0,001$; $2,23 \pm 0,06$, $p_1<0,05$; $1,29 \pm 0,04$, $p_1<0,001$ соответственно), однако, содержание липидов ($p_2<0,001$) и СЦК неспецифической эстеразы ($p_2<0,01$)

статистически значимо возрастали по сравнению с аналогичными значениями в предыдущий период исследования (табл. 3).

Исследование у больных лихорадочной формой клещевого энцефалита способности мононуклеарных лейкоцитов периферической крови секретировать цитокины показало увеличение базальной, стимулированной продукции и индекса стимуляции ИФН- γ ($80,34 \pm 8,67$ пг/мл, $p_1 < 0,01$; $232,86 \pm 26,04$ пг/мл, $p_1 < 0,01$; $2,82 \pm 0,21$, $p_1 < 0,01$ соответственно) (табл. 4), увеличение базальной продукции ФНО- α при снижении его индекса стимуляции ($136,36 \pm 11,17$ пг/мл, $p_1 < 0,01$ и $1,71 \pm 0,12$, $p_1 < 0,05$ соответственно), уменьшение индекса стимуляции ИЛ-12 ($1,06 \pm 0,08$, $p_1 < 0,05$) (табл. 4). Концентрация оксида азота в супернатантах сыворотки крови у больных лихорадочной формой КЭ свидетельствовала о снижении его базальной ($4,53 \pm 0,44$ мМ/мл, $p_1 < 0,01$) и стимулированной ($3,29 \pm 0,39$ мМ/мл, $p_1 < 0,001$) продукции, резерва продукции данного радикала ($0,728 \pm 0,048$, $p_1 < 0,001$) (табл. 4).

Кроме того, при проведении корреляционного анализа между различными показателями у больных с лихорадочной формой клещевого энцефалита были установлены положительные функциональные связи между количеством Fc γ -экспрессирующих моноцитов и продукцией ИФН- γ ($r=0,68$, $p < 0,05$), средним цитохимическим коэффициентом гликогена в моноцитах ($r=0,72$, $p < 0,05$), продукцией ФНО- α и количеством гликогенпозитивных моноцитов ($r=0,59$, $p < 0,05$), показателем активности нейтрофилов ($r=0,63$, $p < 0,05$), продукцией мононуклеарами оксида азота и ИЛ-12 ($r=0,85$, $p < 0,05$) и отрицательные между количеством C3 β -экспрессирующих моноцитов/макрофагов периферической крови и продукцией ИФН- γ ($r=-0,79$, $p < 0,05$), показателем завершенности фагоцитоза и количеством липидположительных нейтрофильных гранулоцитов ($r=-0,86$, $p < 0,05$).

3.2.2. Фагоцитарный статус нейтрофильных гранулоцитов у больных клещевым энцефалитом (лихорадочная форма)

Параметры, отражающие фагоцитарную активности нейтрофильных гранулоцитов у больных, обследованных на 2-ой неделе заболевания, были сопоставимы с контрольными значениями (табл. 5). Однако к 4-ой неделе показатель завершенности фагоцитоза увеличивался до $71,79 \pm 1,87\%$, что

достоверно ($p < 0,001$) отличалось от ПЗФ как у здоровых доноров, так и у больных лихорадочной формой КЭ, обследованных на 2-ой неделе заболевания (табл. 5).

Цитохимический статус полиморфноядерных лейкоцитов показал прогрессирующий дефицит активности щелочной фосфатазы и содержания неферментных катионных белков, наиболее выраженный на 4-ой неделе заболевания ($0,331 \pm 0,061$, $p_{1,2} < 0,001$ и $1,59 \pm 0,10$, $p_1 < 0,001$ соответственно). В динамике лихорадочной формы клещевого энцефалита обнаружено преходящее уменьшение уровня МП на фоне некоторого повышения активности КФ с нормализацией этих показателей к 4-ой неделе инфекционного процесса (табл. 6).

Количество гликогенположительных нейтрофилов периферической крови у больных лихорадочной формой КЭ, обследованных на 2-ой неделе заболевания, снижалось по сравнению с их содержанием в группе контроля ($2,24 \pm 0,07$, $p_1 < 0,001$) (табл. 6). Уровень гликогена и липидов в нейтрофильных гранулоцитах крови у тех же пациентов на 4-ой неделе оказался значительно ниже, чем у здоровых доноров ($2,26 \pm 0,06$, $p_1 < 0,001$ и $2,36 \pm 0,06$, $p_1 < 0,001$) (табл. 6). Результаты теста восстановления нитросинего тетразолия выявили увеличение числа НСТ-позитивных нейтрофильных гранулоцитов на протяжении всего периода наблюдения (табл. 5).

Очевидно, что интерпретация результатов, характеризующих функциональный статус клеток периферической крови у пациентов, получавших терапию, вызывает интерес с точки зрения влияния препаратов, получаемых больными в процессе лечения, на показатели, отражающие фагоцитарную активность моно- и полиморфноядерных лейкоцитов периферической крови. В связи с этим нами был проведен сравнительный анализ базальной продукции ИФН- γ (пг/мл), показателей активности нейтрофильного фагоцитоза, макрофагального фагоцитоза и рецепторного аппарата моноцитов/макрофагов у больных лихорадочной формой клещевого энцефалита (2 неделя заболевания), получавших: 1) противоклещевой иммуноглобулин, 2) йодантипирин. В результате были получены данные, свидетельствующие об отсутствии достоверных различий между исследуемыми показателями в группах пациентов с различной терапией (табл. 7). Обращало на себя внимание возрастание базальной продукции ИФН- γ ($85,27 \pm 3,52$, пг/мл) у пациентов, получавших противоклещевой иммуноглобулин, однако

значения ее не достигали статистически значимых различий по сравнению с аналогичным показателем у больных, получавших йодантипирин (табл. 7).

Таблица 7

Функциональный статус фагоцитов периферической крови у больных клещевым энцефалитом, получавших противоклещевой иммуноглобулин и йодантипирин ($\bar{X} \pm m$)

Изучаемые показатели		Пациенты, получавшие противоклещевой иммуноглобулин (n=15)	Пациенты, получавшие йодантипирин (n=18)
Продукция ИФН- γ , пг/мл		85,27 \pm 3,52	81,68 \pm 5,65
Количество рецептор-экспрессирующих моноцитов/макрофагов (%)	C3 β^+ -клетки	28,56 \pm 2,54	27,93 \pm 1,15
	Fc γ^+ -клетки	29,35 \pm 1,18	26,81 \pm 4,56
Фагоцитарная активность моноцитов/макрофагов (ед. опт. плотности)		135,25 \pm 5,13	128,87 \pm 3,95
Фагоцитарная активность нейтрофильных гранулоцитов	Показатель активности нейтрофилов (%)	63,35 \pm 0,62	62,68 \pm 1,39
	Поглотительная способность нейтрофилов (ед.)	5,43 \pm 0,86	5,90 \pm 0,10
	Показатель завершенности фагоцитоза (%)	61,95 \pm 0,73	60,92 \pm 1,87

3.2.3. Функциональные особенности моноядерных лейкоцитов периферической крови у больных стертой формой клещевого энцефалита

Результаты, полученные при оценке экспрессии рецепторов на поверхности моноцитов периферической крови у больных стертой формой клещевого энцефалита, позволили выявить достоверное снижение количества C3 β^+ -моноцитов/макрофагов по сравнению с количеством их у здоровых доноров (24,67 \pm 1,54%, $p_1 < 0,001$ и 32,56 \pm 1,77%, $p_1 < 0,01$ – 2-ая и 4-ая недели заболевания соответственно). При этом уровень экспрессии C3 β R у больных, обследованных на 4-ой неделе заболевания, статистически значимо превышал аналогичный как у больных в предыдущий период заболевания ($p_3 < 0,01$), так и у больных лихорадочной формой клещевого энцефалита ($p_4 < 0,05$) (табл. 2).

Кроме того, у пациентов, страдающих стертой формой КЭ, обследованных на 2-ой неделе заболевания, снижалось по сравнению с группой контроля и больных ЛФ КЭ относительное количество Fcγ-рецепторпозитивных моноцитарных клеток и фагоцитарная активность моноцитов/макрофагов ($21,67 \pm 1,83$ %, $p_1 < 0,001$, $p_2 < 0,05$ и $102,89 \pm 4,53$ %, $p_1 < 0,01$, $p_2 < 0,05$ соответственно) (табл. 2). У тех же больных к 4-ой неделе заболевания интенсивность фагоцитарной активности нормализовалась ($117,33 \pm 4,70$ ед. опт. плотности при норме $123,60 \pm 2,76$ ед. опт. плотности), однако относительное содержание Fcγ⁺-моноцитов оставалось сниженным ($23,89 \pm 1,67$ % при норме $42,76 \pm 1,33$, $p_1 < 0,001$).

Сравнительный анализ цитохимических характеристик моноцитарных клеток у больных стертой формой клещевого энцефалита позволил установить снижение количества гликоген- и липидположительных моноцитов относительно аналогичных показателей у здоровых доноров ($0,910 \pm 0,048$, $p_1 < 0,001$ и $0,483 \pm 0,047$, $p_1 < 0,001$ гликоген и липиды соответственно – 2-ая неделя заболевания; $0,808 \pm 0,054$, $p_1 < 0,001$ и $0,988 \pm 0,030$, $p_1 < 0,001$ - 4-ая неделя заболевания) (табл. 3). Сопоставление этих результатов с аналогичными параметрами у больных ЛФ КЭ в соответствующие периоды показало, что СЦК гликогена оказался повышенным, а уровень липидов, напротив, уменьшенным (табл. 3). Статистически значимых различий в содержании гликогена в моноцитах у больных на 2-ой и 4-ой неделях заболевания обнаружено не было, однако липидов в моноцитах у пациентов со стертой формой клещевого энцефалита выявлялось достоверно в большем количестве в финале острого периода болезни ($p_3 < 0,001$) (табл. 3).

СЦК неспецифической эстеразы у больных стертой формой КЭ на 2-ой неделе заболевания был сопоставим с контрольными значениями, но оказался сниженным относительно соответствующих параметров у пациентов с лихорадочной формой клещевого энцефалита ($0,831 \pm 0,063$, $p_2 < 0,001$) (табл. 3). Активность же фермента у больных, обследованных на 4-ой неделе, имела тенденцию к угнетению по сравнению с соответствующим показателем у здоровых людей, у тех же пациентов на 2-ой неделе заболевания и у больных лихорадочной формой клещевого энцефалита ($0,317 \pm 0,044$, $p_1 < 0,001$, $p_3 < 0,001$, $p_4 < 0,001$). Цитохимическое исследование миелопероксидазы моноцитарных клеток у больных стертой формой

клещевого энцефалита показало снижение уровня МП к 4-ой неделе заболевания (до $0,020 \pm 0,009$, $p_1 < 0,01$, $p_3 < 0,05$) (табл. 3).

3.2.4. Фагоцитарный статус нейтрофильных гранулоцитов у больных стертой формой клещевого энцефалита

Исследование фагоцитарного статуса полиморфноядерных лейкоцитов периферической крови позволило выявить у больных стертой формой клещевого энцефалита на 4-ой неделе заболевания снижение показателя активности ($56,33 \pm 2,42\%$) и поглотительной способности клеток ($4,11 \pm 0,37$ ед.) по сравнению с аналогичными показателями как у здоровых доноров ($p < 0,01$), так и у тех же больных, обследованных на 2-ой неделе заболевания ($p < 0,05$) (табл. 5). Сравнительный анализ показателя завершенности фагоцитоза позволил установить, что у больных стертой формой КЭ как на 2-ой, так и на 4-ой неделе заболевания он оказался достоверно ($p_2 < 0,05$, $p_4 < 0,05$) ниже, чем у больных лихорадочной формой клещевого энцефалита, обследованных в те же сроки заболевания, и при этом оказался сопоставим с контрольными значениями (табл. 5). Вместе с этим, при выписке из стационара ПЗФ имел тенденцию к увеличению.

Цитохимическое исследование активности гидролаз выявило снижение СЦК щелочной фосфатазы у пациентов, страдающих стертой формой клещевого энцефалита, на протяжении всего периода болезни ($0,898 \pm 0,044$, $p_1 < 0,001$ и $1,86 \pm 0,05$, $p_1 < 0,05$ – 2-ая и 4-ая недели заболевания соответственно) (табл. 6). Однако активность фермента на 4-ой неделе заболевания оказалась значительно выше по сравнению с таковой как в предыдущую стадию заболевания ($p_3 < 0,001$), так и на 4-ую неделю заболевания лихорадочной формой клещевого энцефалита ($p_4 < 0,001$). Кроме того, у больных и на 2-ой, и на 4-ой неделе заболевания регистрировалась повышенная активность кислой фосфатазы ($1,06 \pm 0,03$, $p_1 < 0,05$; $1,05 \pm 0,03$, $p_1 < 0,05$). Изменения СЦК миелопероксидазы нейтрофильных гранулоцитов периферической крови у пациентов, страдающих стертой формой КЭ, имели разнонаправленный характер: увеличение по сравнению с аналогичным показателем у здоровых людей и у больных лихорадочной формой клещевого энцефалита активности МП на 2-ой неделе заболевания ($2,25 \pm 0,07$, $p_1 < 0,01$, $p_2 < 0,001$) и уменьшение по сравнению с величиной этого показателя у пациентов

вышеназванных групп наблюдения к 4-ой неделе заболевания ($0,977 \pm 0,039$, $p_{1,3} < 0,001$, $p_4 < 0,01$) (табл. 6). СЦК гликогена нейтрофилов у больных на 2-ой неделе заболевания оказался достоверно ниже нормы ($2,17 \pm 0,05$, $p_1 < 0,01$ при $2,61 \pm 0,06$ у здоровых лиц). Однако к 4-ой неделе заболевания отмечалась его нормализация ($2,67 \pm 0,05$, $p_3 < 0,001$) (табл. 6). При сравнительном анализе липидопозитивных нейтрофильных гранулоцитов у пациентов стертой формой клещевого энцефалита на 2-ой неделе заболевания обращало на себя внимание уменьшение содержания липидов по сравнению с уровнем их у здоровых людей и у больных лихорадочной формой КЭ ($1,94 \pm 0,06$, $p_1 < 0,001$, $p_2 < 0,001$) и нормализация данного показателя к 4-ой неделе, сопровождающаяся статистически значимым отличием от аналогичного как в предыдущей стадии заболевания, так и у пациентов с ЛФ КЭ ($2,90 \pm 0,06$, $p_3 < 0,001$, $p_4 < 0,001$) (табл. 6). У всех больных, страдающих стертой формой клещевого энцефалита, регистрировалось снижение содержания НКБ ($1,86 \pm 0,07$, $p_1 < 0,001$ и $1,83 \pm 0,07$, $p_1 < 0,001$ – 2-ая и 4-ая недели заболевания соответственно) (табл. 6).

При проведении НСТ-теста процент диформазапозитивных нейтрофильных гранулоцитов составил $34,89 \pm 2,29$ ($p_1 < 0,01$) у пациентов, страдающих стертой формой клещевого энцефалита (2-ая неделя заболевания) и $29,00 \pm 2,09$ ($p_1 < 0,05$) (4-ая неделя заболевания), что достоверно превышало аналогичный показатель в контрольной группе (табл. 5).

3.2.5. Функциональные особенности моноядерных лейкоцитов периферической крови у больных субклинической формой клещевого энцефалита (хроническое персистентное вирусоносительство)

У пациентов с хроническим персистентным вирусоносительством обращало на себя внимание достоверное увеличение процентного содержания как Fc γ -рецепторнесущих ($50,94 \pm 4,30\%$, $p_1 < 0,05$), так и С3 β -рецепторнесущих ($54,31 \pm 2,25\%$, $p_1 < 0,001$) моноцитарных клеток (табл. 2). Фагоцитарная активность моноцитов/макрофагов периферической крови также значительно превышала аналогичные показатели в группе контроля ($152,37 \pm 7,76$ ед. опт. плотности, $p_1 < 0,01$ при $123,60 \pm 2,76$ ед. опт. плотности в норме).

Цитохимическое исследование выявило достоверное снижение активности неспецифической эстеразы по сравнению с ее уровнем у здоровых людей ($0,595 \pm 0,047$, $p_1 < 0,001$) (табл. 3).

Исследование цитокинсекретирующей способности лейкоцитов периферической крови у больных с хроническим персистентным вирусоносительством позволило выявить снижение по отношению к подобному показателю у здоровых людей стимулированной продукции и индекса стимуляции ФНО- α ($97,25 \pm 5,41$ пг/мл, $p_1 < 0,01$ и $1,06 \pm 0,02$, $p_1 < 0,01$ соответственно), ИФН- γ ($29,90 \pm 2,92$ пг/мл, $p_1 < 0,01$ и $1,03 \pm 0,04$, $p_1 < 0,01$ соответственно), а также оксида азота ($9,48 \pm 0,51$ пг/мл, $p_1 < 0,001$ и $1,23 \pm 0,09$, $p_1 < 0,001$) (табл. 4). При этом базальная и стимулированная продукция ИЛ-12 превышала контрольные значения ($30,34 \pm 2,41$ пг/мл, $p_1 < 0,01$ и $38,89 \pm 3,37$ пг/мл, $p_1 < 0,05$ соответственно) (табл. 4).

3.2.6. Фагоцитарный статус нейтрофильных гранулоцитов у больных субклинической формой клещевого энцефалита (хроническое персистентное вирусоносительство)

Проведенное нами исследование фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови позволило выявить достоверное ($p_1 < 0,001$) по сравнению с таковой в группе контроля увеличение поглотительной способности клеток ($6,54 \pm 0,22$ ед.) (табл. 5).

Изучение цитохимического статуса у пациентов с хроническим персистентным вирусоносительством позволило установить статистически значимое, по сравнению с подобными показателями у здоровых людей, снижение активности щелочной фосфатазы ($1,71 \pm 0,15$, $p_1 < 0,01$), кислой фосфатазы ($0,713 \pm 0,059$, $p_1 < 0,001$) и СЦК НКБ ($1,99 \pm 0,03$, $p_1 < 0,001$) (табл. 6).

У больных субклинической формой КЭ значительно увеличивалась активность теста восстановления нитросинего тетразолия, достоверно превышая его значения в контрольной группе ($43,31 \pm 2,02$, $p_1 < 0,001$ при $21,80 \pm 1,89$ в норме).

Проведенный нами корреляционный анализ выявил положительные функциональные связи между поглотительной способностью нейтрофилов и СЦК гликогена в нейтрофилах ($r=0,65$, $p < 0,05$), интенсивностью макрофагального фагоцитоза и продукцией ИФН- γ ($r=0,70$, $p < 0,05$), относительным количеством Fc γ и C3 β -экспрессирующих моноцитов ($r=0,92$, $p < 0,05$), отрицательные - между

активностью макрофагального фагоцитоза и продукцией ИЛ-12 ($r=-0,87$, $p<0,05$), количеством $Fc\gamma R^+$ -моноцитов и продукцией ФНО- α ($-r=0,68$, $p<0,05$), количеством $C3\beta R^+$ -моноцитов и продукцией ФНО- α ($r=-0,55$, $p<0,05$), поглотительной способностью нейтрофилов и продукцией оксида азота ($r=-0,63$, $p<0,05$).

3.2.7. Функциональные особенности моноядерных лейкоцитов периферической крови у больных хроническим клещевым энцефалитом (полиомиелитическая форма)

Изучение фагоцитарного статуса моноцитов периферической крови у больных хроническим клещевым энцефалитом (ХКЭ) позволило выявить статистически значимое увеличение относительного количества $Fc\gamma R$ -экспрессирующих моноцитов/макрофагов периферической крови по сравнению с таковым у здоровых людей и у больных, страдающих острыми (лихорадочная и стертая) формами клещевого энцефалита ($52,32\pm 1,32\%$, $p_{1-4,6}<0,001$) (табл. 2). Относительное содержание $C3$ -рецепторнесущих моноцитарных клеток у больных полиомиелитической формой КЭ ($39,42\pm 2,61\%$) не отличалось от подобного в группе контроля ($42,56\pm 1,36\%$), однако являлось повышенным по сравнению с количеством их у больных лихорадочной и стертой формами клещевого энцефалита ($p_{2,4}<0,001$, $p_3<0,01$), но сниженным по сравнению с соответствующим числом у пациентов с хроническим персистентным вирусоносительством ($p_5<0,001$) (табл. 2). При этом фагоцитарная активность мононуклеарных клеток соответствовала $89,84\pm 3,05$ ед. опт. плотности, что оказалось достоверно ниже, чем во всех прочих исследуемых группах обследуемых лиц (табл. 2).

Содержание гликогена в моноцитах периферической крови у больных хроническим клещевым энцефалитом соответствовало контрольным значениям, однако было достоверно ниже аналогичных значений у больных с острыми формами клещевого энцефалита ($p_2<0,001$, $p_3<0,01$, $p_4<0,001$, $p_6<0,001$), при этом, однако, превышало соответствующий уровень у больных с субклинической формой КЭ ($p_5<0,05$) (табл. 3). Содержание липидов в моноцитарных клетках периферической крови у больных данной группы составляло $1,91\pm 0,09$, что оказалось значительно ниже, чем у здоровых доноров ($p_1<0,001$), больных лихорадочной (4 неделя заболевания) и субклинической формами КЭ ($p_4<0,05$, $p_5<0,001$), но в то же время достоверно превышало их количество у пациентов с

лихорадочной (2-ая неделя заболевания) ($p_2 < 0,001$) и стертой (2-ая и 4-ая недели заболевания) ($p_3 < 0,001$, $p_6 < 0,001$) формами клещевого энцефалита (табл. 3).

Активность неспецифической эстеразы моноцитов периферической крови у больных хроническим клещевым энцефалитом оказалась повышенной по сравнению с таковой у здоровых людей ($p_1 < 0,01$), больных стертой формой клещевого энцефалита ($p_3 < 0,01$, $p_6 < 0,001$ – 2-ая и 4-ая неделя заболевания соответственно), субклинической формой КЭ ($p_5 < 0,001$), но ниже соответствующих значений на 4-ой неделе заболевания лихорадочной формой КЭ ($p_4 < 0,05$) (табл. 3). У больных хроническим клещевым энцефалитом активность миелопероксидазы в моноцитарных клетках не выявлялась (табл. 3).

Сравнительный анализ содержания в супернатантах больных хроническим клещевым энцефалитом цитокинов позволил установить тенденцию к увеличению секреции мононуклеарами ИЛ-12 по сравнению с таковой в контроле и у больных лихорадочной формой КЭ (базальная секреция составила $37,43 \pm 5,37$ пг/мл, $p_1 < 0,05$; стимулированная - $48,81 \pm 5,71$ пг/мл, $p_1 < 0,05$, $p_2 < 0,05$; индекс стимуляции – $1,38 \pm 0,11$, $p_2 < 0,05$) (табл. 4).

Стимулированная продукция ФНО- α оказалась пониженной относительно подобного показателя у здоровых доноров и у больных лихорадочной формой КЭ, при этом, однако, превышая данные показатели у пациентов с субклинической формой клещевого энцефалита ($122,04 \pm 6,86$ пг/мл, $p_1 < 0,01$, $p_2 < 0,01$, $p_3 < 0,05$). Индекс стимуляции ФНО- α также снижался ($1,15 \pm 0,06$, $p_{1,2} < 0,01$).

У больных хронической формой КЭ базальная продукция ИФН- γ превышала аналогичный показатель у здоровых людей и у больных с хроническим персистентным вирусоносительством, однако не достигала значений, сопоставимых с подобными у пациентов с лихорадочной формой клещевого энцефалита ($50,11 \pm 2,84$ пг/мл, $p_1 < 0,05$, $p_{2,3} < 0,01$) (табл. 4). Напротив, стимулированная секреция ИФН- γ , также как и резерв продукции данного цитокина, определялись на уровне $60,51 \pm 4,94$ пг/мл ($p_1 < 0,05$, $p_{2,3} < 0,01$) и $1,22 \pm 0,11$ ($p_{1,2} < 0,01$), что оказалось достоверно ниже соответствующих значений у здоровых лиц и у больных ЛФ КЭ (табл. 4).

Изучение продукции мононуклеарными клетками периферической крови оксида азота позволило выявить снижение его стимулированной секреции

($4,47 \pm 0,49$ мМ/мл, $p_1 < 0,001$, $p_3 < 0,001$) и индекса стимуляции ($0,741 \pm 0,064$, $p_1 < 0,001$, $p_3 < 0,01$) по сравнению с подобными показателями у здоровых доноров и у больных субклинической формой КЭ (табл. 4).

3.2.8. Фагоцитарный статус нейтрофильных гранулоцитов у больных хроническим клещевым энцефалитом (полиомиелитическая форма)

Показатель активности полиморфноядерных лейкоцитов у больных хроническим клещевым энцефалитом определялся на уровне $55,16 \pm 2,29\%$ и оказался достоверно сниженным по сравнению с аналогичными значениями как у здоровых доноров ($p < 0,001$), так и у больных с лихорадочной формой клещевого энцефалита 2-ой ($p < 0,05$) и 4-ой ($p < 0,01$) недели заболевания (табл. 5). Наряду с этим, у больных хроническим клещевым энцефалитом поглотительная способность нейтрофильных гранулоцитов периферической крови, также как и показатель завершенности фагоцитоза, имели тенденцию к увеличению. Так, ПСН оказалась равной $6,95 \pm 0,45$ ед., что статистически значимо превышало этот показатель в норме ($p < 0,001$) и у больных с лихорадочной и стертой формами клещевого энцефалита во все стадии заболевания (табл. 5). Уровень завершенности фагоцитоза достоверно отличался от контрольных параметров и от соответствующих значений у больных с лихорадочной и стертой формами КЭ на 2-ой неделе заболевания ($67,16 \pm 1,31\%$) (табл. 5).

У больных хроническим клещевым энцефалитом была зарегистрирована более высокая активность кислой фосфатазы ($1,15 \pm 0,06$, $p_1 < 0,05$, $p_5 < 0,001$), чем у здоровых доноров и у пациентов с субклинической формой КЭ (табл. 6). Активность щелочной фосфатазы оказалась сниженной по сравнению с таковой в контроле и у больных стертой формой клещевого энцефалита (4-ая неделя заболевания), при этом превышала соответствующие значения у пациентов с лихорадочной и стертой формами (2-ая неделя заболевания) клещевого энцефалита (табл. 6). СЦК миелопероксидазы нейтрофильных гранулоцитов периферической крови у больных ХКЭ составлял $1,69 \pm 0,07$, что отличалось от такового у больных стертой формой КЭ ($p_{3,6} < 0,001$) (табл. 6).

Содержание неферментных катионных белков оказалось достоверно ниже

такового в контроле, при этом, однако, превышало их уровень у больных лихорадочной формой клещевого энцефалита ($1,95 \pm 0,08$, $p_{1,2} < 0,05$ и $p_4 < 0,01$) (табл. 6). Содержание гликогена ($2,62 \pm 0,04$, $p_{2-4} < 0,001$, $p_5 < 0,05$) и липидов ($2,71 \pm 0,05$, $p_{2,6} < 0,05$, $p_{3,4} < 0,001$) в нейтрофильных гранулоцитах периферической крови у больных хроническим клещевым энцефалитом было сопоставимо с контрольными значениями, однако достоверно отличалось от количества гликоген- и липидпозитивных клеток у больных острыми формами клещевого энцефалита и хроническим персистентным вирусоносительством (табл. 6).

Результаты, полученные при проведении теста восстановления нитросинего тетразолия у больных хроническим клещевым энцефалитом ($51,74 \pm 1,18\%$), позволили говорить о значительном превышении данного показателя над аналогичными параметрами у здоровых доноров, больных лихорадочной, стертой и субклинической формами клещевого энцефалита ($p_1- p_4 < 0,001$, $p_5 < 0,01$, $p_6 < 0,001$).

У больных хроническим клещевым энцефалитом регистрировались положительные корреляционные связи между продукцией ФНО- α и количеством Fc γ -рецепторнесущих моноцитов ($r=0,86$, $p < 0,05$), уровнем макрофагального фагоцитоза ($r=0,74$, $p < 0,05$), количеством Fc γ^+ -моноцитов и активностью неспецифической эстеразы моноцитов ($r=0,85$, $p < 0,05$) и отрицательные корреляционные связи - между количеством C3 β -экспрессирующих рецепторов и уровнем активности неспецифической эстеразы ($r=-0,57$, $p < 0,05$), продукцией оксида азота и ИФН- γ ($r=-0,91$, $p < 0,05$), продукцией ИЛ-12 ($r=-0,63$, $p < 0,05$).

3.3. Характеристика фагоцитов периферической крови у больных инфекцией-микст (хронический рецидивирующий иксодовый клещевой боррелиоз в сочетании с лихорадочной формой клещевого энцефалита)

3.3.1. Функциональные особенности моноядерных лейкоцитов периферической крови у больных инфекцией-микст

У больных ассоциированной инфекцией, обследованных на 2-ой, и на 4-ой неделе заболевания, относительное содержание C3 β -рецепторпозитивных моноцитарных клеток оказалось значительно ниже, чем в контроле ($31,00 \pm 4,21\%$, $p_1 < 0,05$ и $31,87 \pm 2,78\%$, $p_1 < 0,01$ соответственно). Количество Fc γ -рецепторнесущих моноцитов у всех обследованных пациентов данной группы соответствовало аналогичному показателю у здоровых доноров, однако на 4-ой неделе заболевания

превышало таковой у больных лихорадочной формой клещевого энцефалита ($44,25 \pm 3,80\%$, $p_4 < 0,01$) (табл. 2). Фагоцитарная активность моноцитарных клеток у больных инфекцией-микст оказалась ниже таковой в норме и у больных с лихорадочной формой КЭ (2-ая неделя заболевания – $81,83 \pm 7,45$ ед. опт. плотности, $p_1 < 0,001$, $p_2 < 0,01$, 4-ая неделя заболевания – $93,12 \pm 8,39$ ед. опт. плотности, $p_{1,4} < 0,01$) (табл. 2).

Анализ содержания гликогена в моноцитарных клетках периферической крови у больных хроническим иксодовым клещевым боррелиозом в сочетании с лихорадочной формой клещевого энцефалита ($0,920 \pm 0,073$ - 2-ая, $0,865 \pm 0,076$ - 4-ая недели заболевания) позволил установить статистически значимое снижение его по сравнению с нормой ($p_1 < 0,01$) и, напротив, повышение относительно величины этого показателя у больных с лихорадочной формой клещевого энцефалита ($p_2 < 0,01$, $p_4 < 0,05$) (табл. 3). Содержание липидов было сопоставимо с контрольными значениями, однако превышало СЦК липидов в моноцитах у больных лихорадочной формой КЭ ($2,35 \pm 0,16$, $p_2 < 0,001$) (табл. 3).

Активность неспецифической эстеразы в моноцитарных клетках у больных инфекцией-микст на 2-ой неделе определялась на уровне $0,363 \pm 0,052$, что оказалось достоверно ниже уровня активности фермента как у здоровых людей ($p_1 < 0,001$), так и у больных с лихорадочной формой клещевого энцефалита ($p_2 < 0,001$) (табл. 3). Положительная реакция на НЭ у тех же пациентов на 4-ой неделе заболевания оставалась сниженной ($0,381 \pm 0,075$, $p_1 < 0,05$) (табл. 3). В то же время было зафиксировано снижение уровня миелопероксидазы в моноцитах у больных с сочетанной инфекцией, обследованных на 4-ой неделе заболевания, по сравнению с содержанием данного фермента в моноцитарных клетках у здоровых доноров и у больных с лихорадочной формой КЭ ($0,034 \pm 0,015$, $p_{1,4} < 0,001$) (табл. 3).

Продукция ИФН- γ лейкоцитами периферической крови у больных ассоциированной инфекцией оказалась сопоставимой с контрольными значениями, при этом, однако, оказалась достоверно ниже таковой у больных с лихорадочной формой клещевого энцефалита ($40,85 \pm 5,52$ пг/мл, $p_2 < 0,05$ - базальная, $64,40 \pm 3,44$ пг/мл, $p_2 < 0,01$ - стимулированная) (табл. 4). Следует подчеркнуть также, что резервные возможности клеток продуцировать ИФН- γ были снижены ($1,66 \pm 0,13$, $p_1 < 0,05$, $p_2 < 0,01$) (табл. 4). Сравнительный анализ продукции ИЛ-12 выявил более

низкий уровень его базальной ($14,01 \pm 2,09$ пг/мл, $p_{1, 2} < 0,05$) и стимулированной ($15,67 \pm 2,79$ пг/мл, $p_1 < 0,01$, $p_2 < 0,05$) секреции у больных инфекцией-микст, чем у здоровых доноров и у больных с лихорадочной формой КЭ (табл. 4). Базальная продукция ФНО- α у пациентов с сочетанной инфекцией не отличалась от таковой в контроле, однако была достоверно ниже соответствующего показателя у больных с лихорадочной формой клещевого энцефалита ($81,66 \pm 8,41$ пг/мл, $p_2 < 0,01$). Наряду с этим, стимулированная продукция данного цитокина показывала достоверно более низкие значения, чем у здоровых людей и у больных с лихорадочной формой клещевого энцефалита ($133,67 \pm 9,61$ пг/мл, p_1 и $p_2 < 0,01$) (табл.). Изучение секреции мононуклеарными клетками периферической крови у больных инфекцией-микст оксида азота показало снижение его базальной ($4,97 \pm 0,75$ мМ/мл, $p_1 < 0,05$), стимулированной ($4,08 \pm 0,61$ мМ/мл, $p_1 < 0,01$) продукции и индекса стимуляции ($0,833 \pm 0,061$, $p_1 < 0,01$) по сравнению с контрольными значениями (табл. 4).

3.3.2. Фагоцитарный статус нейтрофильных гранулоцитов у больных инфекцией-микст

При анализе фагоцитарного статуса нейтрофильных гранулоцитов у больных инфекцией-микст на 2-ой неделе заболевания обращало на себя внимание снижение показателя активности полиморфноядерных лейкоцитов по сравнению с контролем ($56,83 \pm 5,16\%$, $p_1 < 0,05$), увеличение поглотительной способности нейтрофилов ($7,62 \pm 0,69\%$) как по сравнению с таковой у здоровых доноров ($p_1 < 0,01$), так и у больных лихорадочной формой КЭ ($p_2 < 0,05$). Однако к 4-ой неделе заболевания поглотительная способность нейтрофилов имела тенденцию к нормализации и достоверно отличалась от ПСН у больных на 2-ой неделе заболевания ($5,42 \pm 0,48\%$, $p_7 < 0,05$) (табл. 5).

Ферментативная активность щелочной фосфатазы у больных инфекцией-микст, обследованных на 2-ой неделе заболевания, была установлена на уровне $0,713 \pm 0,059$ ($p_{1,2} < 0,001$), на 4-ой неделе заболевания – $0,580 \pm 0,037$ ($p_1 < 0,001$, $p_4 < 0,05$), что статистически значимо отличалось от аналогичного показателя у здоровых людей и у больных КЭ (лихорадочная форма) (табл. 6). У пациентов, страдающих ассоциированной инфекцией, активность кислой фосфатазы ($1,67 \pm 0,08$, $p_1 < 0,001$, $p_2 < 0,01$ – 2-ая неделя; $1,49 \pm 0,16$, $p_1 < 0,01$, $p_4 < 0,05$ – 4-ая

неделя) оказалась выше, чем в контроле и у больных с лихорадочной формой клещевого энцефалита (табл. 6). СЦК неферментных катионных белков нейтрофилов соответствовал $2,25 \pm 0,11$, $p_2 < 0,01$ и $2,05 \pm 0,12$, $p_4 < 0,05$ (2-ая и 4-ая недели заболевания соответственно), достоверно не отличаясь от аналогичного показателя у здоровых людей, однако превышая значения СЦК неферментных катионных белков у больных с лихорадочной формой клещевого энцефалита (табл. 6). Содержание гликогена и липидов в нейтрофильных гранулоцитах периферической крови у пациентов с инфекцией-микст не изменялось на протяжении заболевания (табл. 6). Однако обращал на себя внимание факт достоверного превышения количества липидположительных нейтрофилов у больных ассоциированной инфекцией по сравнению с таковым у пациентов с лихорадочной формой заболевания.

Относительное количество диформазапозитивных клеток у больных инфекцией-микст также оказалось увеличенным по сравнению с таковым в норме ($39,83 \pm 2,94$, $p_1 < 0,01$ и $34,00 \pm 4,10$, $p_1 < 0,05$ – 2-ая и 4-ая недели заболевания соответственно) (табл. 5).

Проведенное нами исследование функциональных связей между различными параметрами у больных инфекцией-микст позволило установить положительные корреляционные связи между количеством $Fc\gamma R^+$ -моноцитов и продукцией мононуклеарами ФНО- α ($r=0,70$, $p < 0,05$), продукцией оксида азота и количеством $Fc\gamma R^+$ ($r=0,75$, $p < 0,05$) и $C3\beta R^+$ -моноцитов ($r=0,83$, $p < 0,05$) и отрицательные корреляционные связи между продукцией ИФН- γ и количеством $C3\beta R^+$ -моноцитов ($r=-0,63$, $p < 0,05$) и продукцией оксида азота ($r=-0,77$, $p < 0,05$), показателем завершенности фагоцитоза и активностью щелочной фосфатазы ($r=-0,62$, $p < 0,05$).

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Система моно- и полиморфноядерных лейкоцитов периферической крови является одной из наиболее чувствительных к повреждающему действию инфекционных агентов систем макроорганизма, клеточным элементам которой принадлежит основная роль в формировании противоинфекционного иммунитета [Маянский А.Н., 1993; Фролова О.Е., 1998; А.А. Тотолян, И.С. Фрейдлин, 1999; Saito M. et al., 2002].

Не вызывает сомнений, что вирусемия является важнейшим звеном патогенеза вирусных инфекций. В связи с этим вполне закономерно повышенное в последние годы внимание исследователей к вопросу о роли лейкоцитов в механизмах возникновения и развития инфекционного процесса, обусловленного персистенцией вирусов в организме [Наследникова И.О., 2002; Уразова О.И., 2002].

Известно, что цитопатические процессы при действии инфекционных возбудителей определяются не только свойствами самого инфекционного агента, но и непосредственным участием в этом процессе иммунокомпетентных клеток периферической крови. Эксперименты на изолированной культуре лейкоцитов человека показали, что вирусы клещевого энцефалита не просто поглощаются фагоцитами, но вне зависимости от способа проникновения в клетку не утрачивают своей жизнеспособности, проявляя высокую устойчивость к внутриклеточным микробицидным факторам, могут длительно персистировать и имеют возможность репродуцироваться, накапливаться и выходить в плазму, подавляя продукцию вирусспецифических антител и регулируя экспрессию вирусных антигенов инфицированными клеточными элементами, с одной стороны, и стимулируя продукцию ими иммуносупрессивных и иммуномодулирующих веществ, тормозящих иммунные реакции организма, с другой [Шаповал А.И., 1980; Смородинцев А.А., Дубов А.В., 1986; Погодина В.В., 1986; Жданов В.М., 1990; Фрейдлин И.С., 1998, 1999; Saxena S.K et al., 2000; Иерусалимский А.П., 2002].

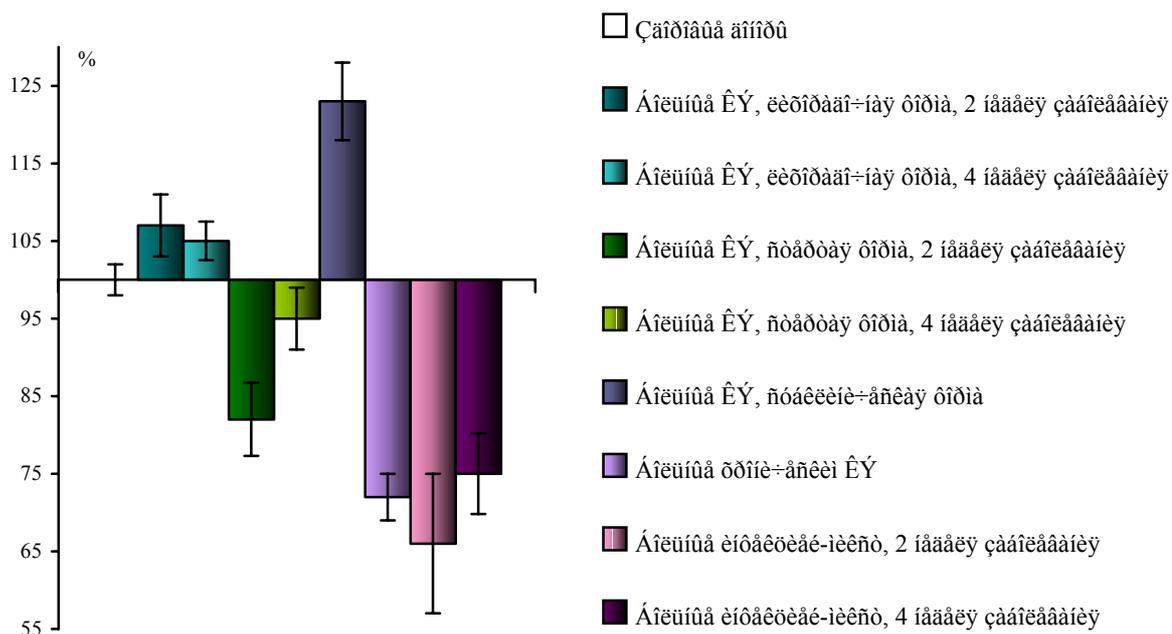
Как известно, одной из ключевых позиций функциональной полноценности клеток является количество и разнообразие рецепторных структур поверхностных мембран, способствующих полноценному выполнению защитных реакций организма, таких как фагоцитоз иммунных комплексов и сенсibilизированных

антителами частиц, представление антигена, антителозависимая клеточная цитотоксичность, рецептор-зависимое освобождение медиаторов воспаления [Чередеев А.Н., 1995; Pleass R.J., Woof J.M., 2001; Drechsler Y. et al., 2002; Garcia-Garcia E. et al., 2002; Ioan-Facsinay A. et al., 2002; Takai T., 2002; Tjelle T.E. et al., 2002].

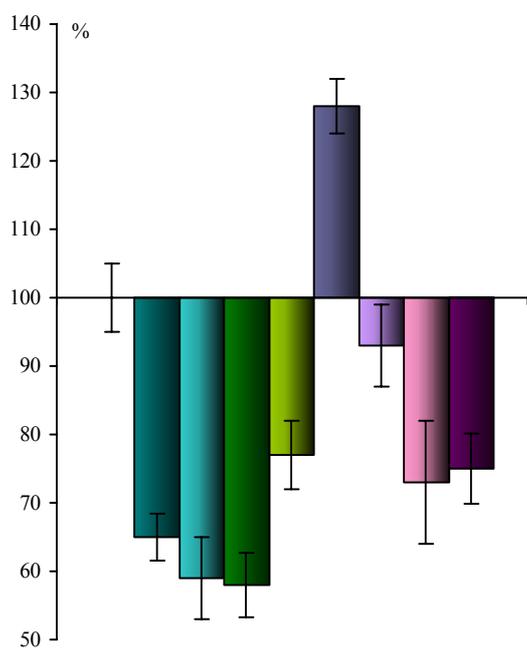
Изменения состояния рецепторного аппарата играют важную роль в развитии инфекционного процесса. Рядом авторов показано, что инфекционные возбудители (в данном случае ВКЭ) способны ингибировать синтез и экспрессию, а также блокировать рецепторы иммунокомпетентных клеток, необходимые для реализации их иммунных функций, что препятствует процессам макрофагальной активации и переключению моноцитов/макрофагов на более эффективный фагоцитоз [Жданов В.М., 1990; Чередеев А.Н., 1995; Chen Y.C. et al., 1997, 1999; Хаитов Р.М. и соавт., 2000; Уразова О.И., 2002].

У больных лихорадочной формой клещевого энцефалита нами отмечалось снижение относительного количества $С3\beta$ - и $F\gamma$ -экспрессирующих моноцитов/макрофагов периферической крови на 2-ой неделе заболевания (на 35 % и 37 % соответственно); причем к 4-ой неделе заболевания уровень экспрессии рецепторов оставался на том же уровне (табл. 2, рис. 6). Особо обращает на себя внимание установленная по итогам проводимого исследования отрицательная корреляция между процентным содержанием $С3\beta^+$ -моноцитов/макрофагов периферической крови у пациентов, страдающих ЛФ КЭ, и уровнем секреции лейкоцитами ИФН- γ (рис. 7). Данный факт может быть связан как с вероятной антирецепторной направленностью действия вируса клещевого энцефалита, так и с обусловленным ведущей ролью моноцитов/макрофагов в обеспечении неспецифической резистентности организма компенсаторным поступлением в периферический кровоток незрелых клеточных элементов, не экспрессирующих указанные рецепторы на поверхностной мембране [Жданов В.М., 1990; Чередеев А.Н., 1995; Chen Y.C. et al., 1997, 1999; Уразова О.И., 2002]. Кроме того, известно, что под действием активирующих факторов макрофаг может приобретать фенотип с компенсаторной избирательной активацией “scavenger” рецепторов, рецепторов типа MMR, MFR, LLM, характерный для вновь поступивших в периферический кровоток моноцитов [Stein M. et al., 1992; Фрейдлин И.С., 1998].

Φαγοцитарная активность моноцитов/макрофагов



C3β⁺ - μονοциты/макрофаги



Fcy⁺ - μονοциты/макрофаги

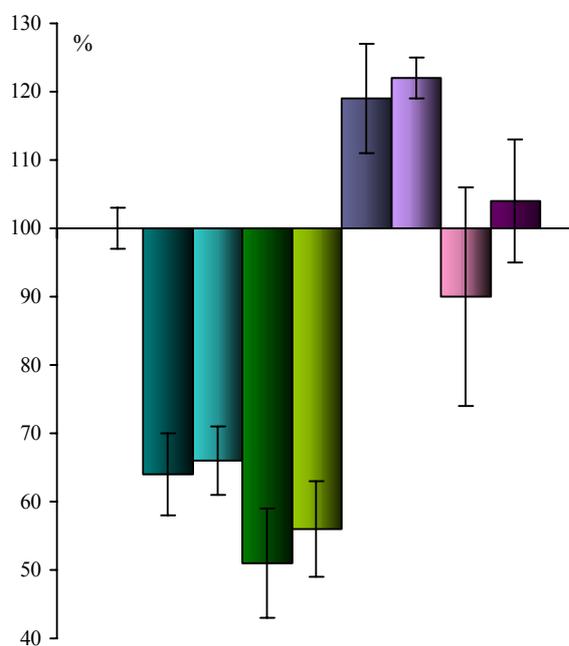


Рис. 6. Фагоцитарная активность моноцитов/макрофагов у больных клещевым энцефалитом и инфекцией-микст (по оси ординат – % от контрольных значений).

Снижение экспрессии С3 β -рецепторов сопровождается подавлением клеточно-опосредованного механизма элиминации патогена. На этом фоне увеличивается продукция ИФН- γ , известного в качестве эффективного противовирусного иммуномодулятора, что может иметь компенсаторное значение, поскольку в конечном итоге это приводит к усилению цитотоксичности антиген-специфичных популяций иммуноцитов и модуляции функциональных возможностей фагоцитирующих клеток периферической крови.

При этом необходимо отметить, что у пациентов, страдающих стертой и лихорадочной формами клещевого энцефалита, выявлялись однонаправленные изменения фагоцитарного статуса моноцитов/макрофагов периферической крови (табл. 2, рис. 6).

Согласно современным представлениям, в процессе выполнения моно- и полиморфноядерными лейкоцитами фагоцитарной функции модулируется их бактерицидный потенциал и содержание субстратов. В связи с этим можно утверждать, что данные о содержании и активности основных клеточных ингредиентов (ферменты, липиды, белки, углеводы и др.) могут внести весьма ценную информацию о характере метаболических взаимоотношений вируса и клетки на разных стадиях течения инфекционного процесса [Робинсон М.В. и соавт., 1986; Бурая Л.Т. и соавт., 1991; Базарный В.В. и соавт., 2001; Уразова О.И., 2002].

Известно, что липиды и гликоген формируют энергетический резерв организма [Хейхоу Дж.Ф.Г., Кваглино Д., 1983; Меньшиков В.В., 1987]. Проведенное нами цитохимическое исследование клеток периферической крови у больных острыми формами клещевого энцефалита позволило выявить снижение количества ШИК-положительных нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов на 2-ой и на 4-ой неделе заболевания (табл. 3, 6, рис. 8, 9). Основными причинами падения уровня гликогена в клетках крови может являться активное расходование метаболита в реакциях внутриклеточного обмена, в процессах фагоцитоза и переваривания генетически чужеродных агентов, в том числе и вирусов [Кисляк Н.С., Ленская Р.В., 1978]. В связи с тем, что уровень гликогена в клетках крови свидетельствует об интенсивности процессов анаэробного гликолиза, снижение синтеза гликогена может обуславливаться недостатком глюкозы в организме.

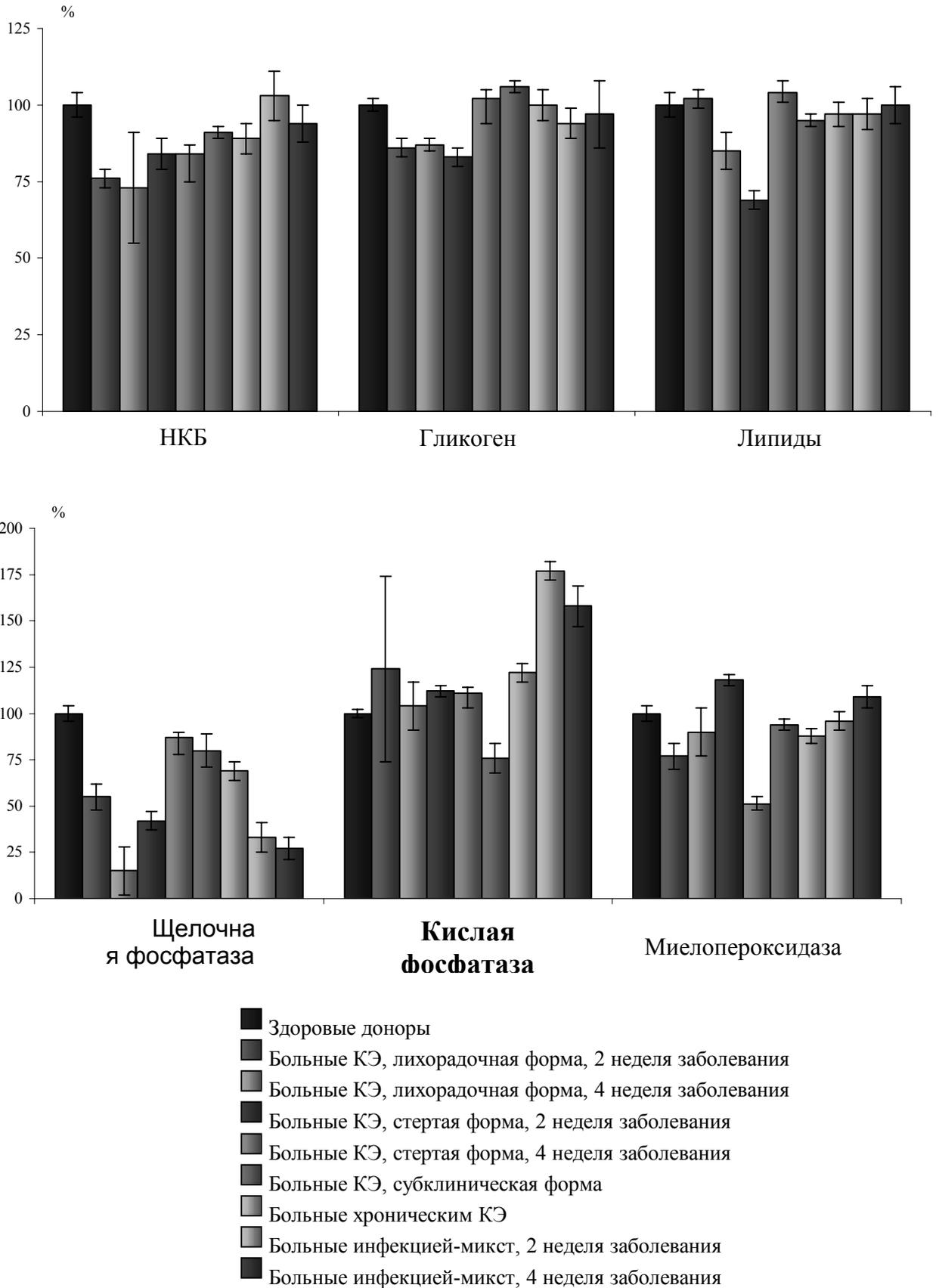


Рис. 9. Цитоэнзимологическая активность и содержание НБК, гликогена и липидов в нейтрофильных гранулоцитах периферической крови у больных клещевым энцефалитом и инфекцией микст (по оси ординат – % от контрольных значений).

Содержание липидов в полиморфноядерных лейкоцитах периферической крови у пациентов с лихорадочной формой клещевого энцефалита достоверно снижалось к 4-ой неделе заболевания, у пациентов же со стертой формой КЭ уже ко 2-ой неделе заболевания (табл. 6, рис. 9). В моноцитах у больных острыми формами КЭ липиды выявлялись на значительно более низком уровне на 2-ой неделе заболевания, к 4-ой неделе отмечалась тенденция к их нормализации, однако количество их в этот период наблюдения так и не достигал нормы (табл. 3, рис. 8). Согласно данным литературы, практически все инфекционные заболевания сопровождаются изменением липидного метаболизма клеток [Хейхоу Дж.Ф.Г., Кваглино Д., 1983]. Следует отметить, что выполнение фагоцитарной функции клетками сопровождается, как правило, стимуляцией обмена липидов вследствие роста энергетических нужд клетки. Так, увеличение содержания липидов в моноцитах отражает высокий уровень внутриклеточного метаболизма и пластического обмена; снижение их концентрации свидетельствует о метаболическом дисбалансе и функциональной неполноценности клеток [Кисляк Н.С., Ленская Р.В., 1978; Меньшиков В.В., 1987]. Поскольку процесс поглощения фагоцитируемого материала происходит при активном участии плазматической мембраны, целостность которой каждый раз восстанавливается после погружения объектов-мишеней в цитоплазму, то индукция липид-синтетических процессов может быть направлена также на восстановление вещества внешней клеточной оболочки [Лукина Е.А. и соавт., 2000]. Снижение содержания липидов и гликогена в моноцитах может быть обусловлено истощением гликогенсинтезируемых ресурсов клеток, поскольку известно, что эти метаболиты активно используются в качестве энергетического материала как в процессе фагоцитирования и переваривания вирусов, так и непосредственно в процессе репродукции ВКЭ. При этом необходимо отметить, что у больных ЛФ клещевого энцефалита выявлялась отрицательная корреляция между содержанием в нейтрофильных гранулоцитах липидов и показателем завершенности фагоцитоза (рис. 7).

Цитохимическое исследование ферментативной активности лейкоцитов периферической крови у больных острыми (лихорадочная, стертая) формами КЭ (2-ая неделя заболевания) позволило выявить снижение активности щелочной фосфатазы, миелопероксидазы и катионных белков сегментоядерных нейтрофилов

и увеличение активности кислой фосфатазы нейтрофилов (табл. 6, рис. 9). СЦК неспецифической эстеразы моноцитарных клеток периферической крови изменялся неоднозначно: увеличивался у больных лихорадочной формой клещевого энцефалита и снижался у больных стертой формой КЭ (табл. 3, рис. 8).

Кислая фосфатаза (КФ) - фермент лизосом, играющих весьма важную роль в процессах фагоцитоза и внутриклеточного переваривания, - отражает уровень дифференцировки и/или функциональной активности клеток (Фролова О.Е., 1998). Существует точка зрения, что количество содержащихся в зрелом нейтрофиле активных форм фермента является величиной постоянной. Вместе с тем, в литературе имеются сведения о том, что большая часть фермента содержится в клетке в неактивной форме, и при стимуляции клетки, возможно, происходит синтез активных форм фермента за счет связывания субстрата с коферментом [Бурая Т.Л. и соавт., 1991]. Уровень активности КФ возрастает (как правило) при развитии инфекционного процесса как бактериальной, так и вирусной этиологии [Бондарев Л.С. и соавт., 1973; Бурая Т.Л. и соавт., 1991].

Увеличение активности лизосомальных энзимов, с одной стороны, повышает защиту клетки от инфекции; с другой – может потенцировать гидролиз белков, полипептидов, ДНК и РНК с формированием дополнительного фонда аминокислот и мононуклеотидов, необходимых для синтеза вирусспецифических протеинов и нуклеиновых кислот, облегчая тем самым процесс вирусной репродукции [Покровский А.А., Тутельян В.А., 1976; Уразова О.И., 2002]. НЭ является одним из наиболее надежных маркерных ферментов мононуклеарных фагоцитов. По данным О.Е. Фроловой [1998], повышение активности данного фермента свидетельствует об увеличении фагоцитарной функции макрофагов.

Согласно современным представлениям, при активации фагоцита происходит перестройка его метаболизма, и в результате так называемого “дыхательного взрыва” образуются активные формы кислорода, обладающие мощной микробицидной активностью [Бурая Т.Л. и соавт., 1991]. Миелопероксидаза, катализируя образование токсических агентов, губительно действует на большинство патогенов, в связи с этим закономерно, что ее уровень значительно повышается при бактериальном инфекционном процессе [Асадов Ч.Д. и соавт., 1990; Ройт А., 1991; Маянский А.Н., 1993; Серов В.В., Пауков В.С., 1995;

Меньшиков В.В., 1987; Arnljots K. et al., 1998; Borregaard N. et al., 2001; Славинский А.А., 2002]. В то же время, согласно исследованиям, проведенным Т.Л. Бурой и соавт. [1991], у больных с вирусными инфекциями выявлено преобладание процессов экскреции фермента над синтезом активных его форм [Бурая Т.Л. и соавт., 1991]. Кроме того, не исключено, что снижение активности МП является следствием повышенного расхода данного фермента для инактивации образующихся вследствие патологического процесса в клетке агрессивных перекисей.

Известно, что нейтрофильные гранулоциты являются мощными генераторами активных форм кислорода (АФК), способными не только оказывать защитное действие, но и вызывать повреждение собственных клеток [Бережная И.М., 1988; Маянский А.Н., 1983, 1991, 1993; Земсков В.М и соавт., 1988]. Реализация эффектов АФК происходит путем прямого влияния на компоненты клеток и органеллы посредством нарушения проницаемости мембран, вызванного модификацией углеводов, белков и липидов кислородными метаболитами, а также нарушением структуры нуклеиновых кислот. К таким модификациям относят галогенирование, декарбоксилирование аминокислот, разрыв пептидных связей, окисление сульфгидрильных групп, инициирование свободнорадикального перекисного окисления липидов. Причем если ранее основным механизмом повреждения считался последний, то в настоящее время получены убедительные данные, свидетельствующие о большей чувствительности клеточных белков к поражающему действию оксидантов. Так, например, гидроксильный радикал усиливает агрегацию белков, индуцирует их фрагментацию, модифицирует аминокислоты в белках, вызывая изменения первичной структуры белковых молекул, определяющие нарушения вторичной и третичной структуры. Кроме того показано, что окислительный взрыв в нейтрофилах сопровождается образованием разрывов в цепи ДНК [Radi R. et al., 1991; Маянский А.Н., 1993; Рябинченко Е.В. и соавт., 2000]

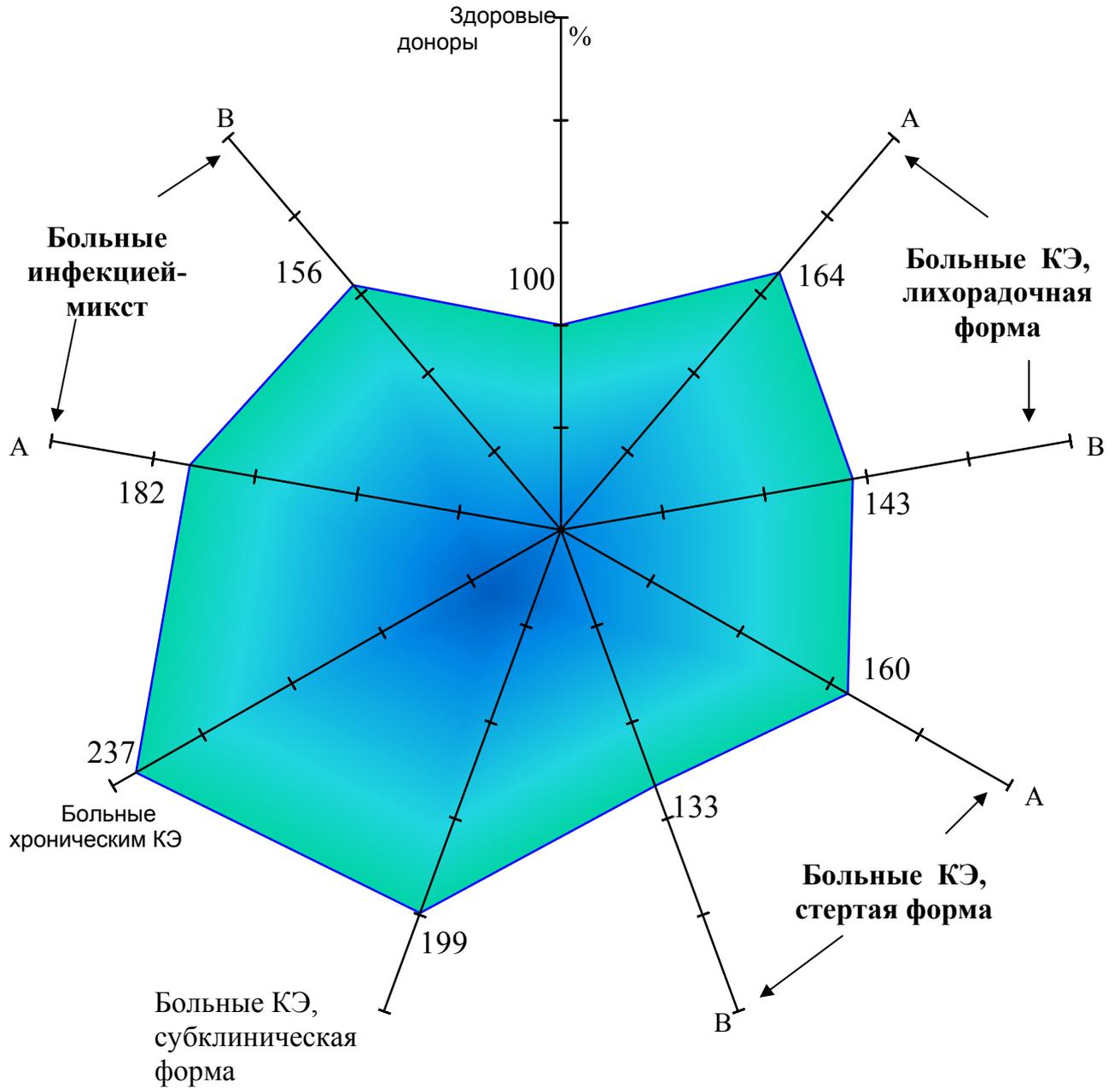
Выявленная нами при анализе полученных результатов повышенная активность нейтрофильных гранулоцитов периферической крови у больных острыми формами клещевого энцефалита в тесте восстановления нитросинего тетразолия, как показателя кислородзависимого механизма бактерицидности,

свидетельствовала, что полиморфноядерные лейкоциты являются постоянным источником усиленной выработки активных форм кислорода, не зависящим от давности инфекционного процесса.

В то же время, обнаруженные в ходе проведенного исследования особенности фагоцитарного статуса нейтрофильных гранулоцитов периферической крови у больных, страдающих стертой формой клещевого энцефалита, отражали бактерицидную напряженность (повышенная продукция АФК) в клетках (табл. 5, рис. 10).

Возможно, повышение оксидантного статуса не означает одновременного увеличения бактерицидных свойств фагоцитирующих клеток. Не исключено, что выброс оксидантов, наблюдаемый в этом случае, вовлекает все энергетические ресурсы клеток, определяя их неполноценность и, как следствие, персистенцию патогена в организме. Согласно данным Е.В. Рябинченко и соавт. [2000] инфекционный процесс может сопровождаться увеличением продукции кислородных метаболитов при значительном снижении фагоцитарной активности клеток.

Итогом взаимодействия в системе патоген – иммунцит – макрофаг является также секреция эффекторными клетками цитокинов и оксида азота [Evans T.J. et al., 1996; Проскураков С.Я., 2000]. Наличие у последнего (NO^\bullet) широкого спектра физиологических функций, сочетание в одном соединении свойств переносчика сигнала, регулятора метаболизма и токсичного агента позволяет ему выполнять роль противоопухолевого и антипатогенного агента, вызывая задержку деления и гибель чужеродных клеток. Синтез соответствующего белка (iNOs) индуцируется под действием провоспалительных и антипатогенных факторов – ИФН- γ , ФНО- α , бактериального липополисахарида. При этом уровни секреции радикала макрофагами определяются доминированием типа иммунного ответа – клеточного или гуморального. Важно, что если в защитной реакции превалируют Th_2 , то это приводит к существенному ингибированию экспрессии iNOs и значительному возрастанию активности аргиназы – фермента, катаболизирующего субстрат для синтеза NO^\bullet . Уменьшение содержания аргинина приводит к снижению секреции окиси азота и соответственно ограничивает ингибирование этим радикалом синтеза



А – 2 неделя заболевания
В – 4 неделя заболевания

Рис. 10. Тест восстановления нитросинего тетразолия у больных клещевым энцефалитом и инфекцией-микст (% от контрольных значений).

ИЛ-12 [Проскураков С.Я., 2000].

Проведенное нами исследование способности мононуклеарных фагоцитов периферической крови у больных острыми формами клещевого энцефалита секретировать NO^\bullet позволило выявить снижение (относительно подобных значений у здоровых доноров) его базальной (на 34%) и стимулированной (на 76%) секреции, а также резервных возможностей клеток продуцировать данный радикал (на 64%) (табл. 4, рис. 11 - 13).

При этом, на наш взгляд, вызывает интерес исследование взаимосвязей между продукцией оксида азота и ИФН- γ , ИЛ-12. Так, корреляционный анализ показал наличие отрицательных корреляционных связей между образованием NO^\bullet и ИЛ-12 (рис. 7). В то же время ожидаемой функциональной связи между продукцией изучаемого радикала и ИФН- γ выявлено не было, что, возможно, являлось следствием нарушения сложной цепи цитокиновых взаимоотношений вследствие выраженной антигенной стимуляции ВКЭ. Кроме того, одной из важных предпосылок, обеспечивающих реализацию эффекта цитокинов, является совпадение условий включения секреции цитокинов и усиления экспрессии их рецепторов на клетках-мишенях [Ярилин А.А., 1997; Кашкин К.П., 1998]. Не исключено, что именно на ингибицию экспрессии генов рецепторов, в частности ИФН- γR , направлено действие вируса клещевого энцефалита.

В настоящее время сложилось представление, что система цитокинов является центральным звеном в объединении различных типов клеток-компонентов защитных реакций организма, регулируя в первую очередь в неспецифическом звене защиты организма индукцию и развитие воспалительных реакций, призванных к деструкции и удалению инфекционного агента. Цитокины участвуют в хемотаксисе клеток воспаления, увеличивают их адгезивность к эндотелию капилляров, окружающих место проникновения патогена, активируют микробицидность и цитотоксичность макрофагов и лейкоцитов, препятствуя распространению патогена в организме путем тромбирования капилляров, повышают температуру тела, уменьшают порог реактивности ЦНС, вызывают продукцию острофазных белков, активируют выброс гормонов гипоталамо-гипофизарной системы [Кетлинский С.А., Калинина Н.М., 1995; Фрейдлин И.С., 1995].

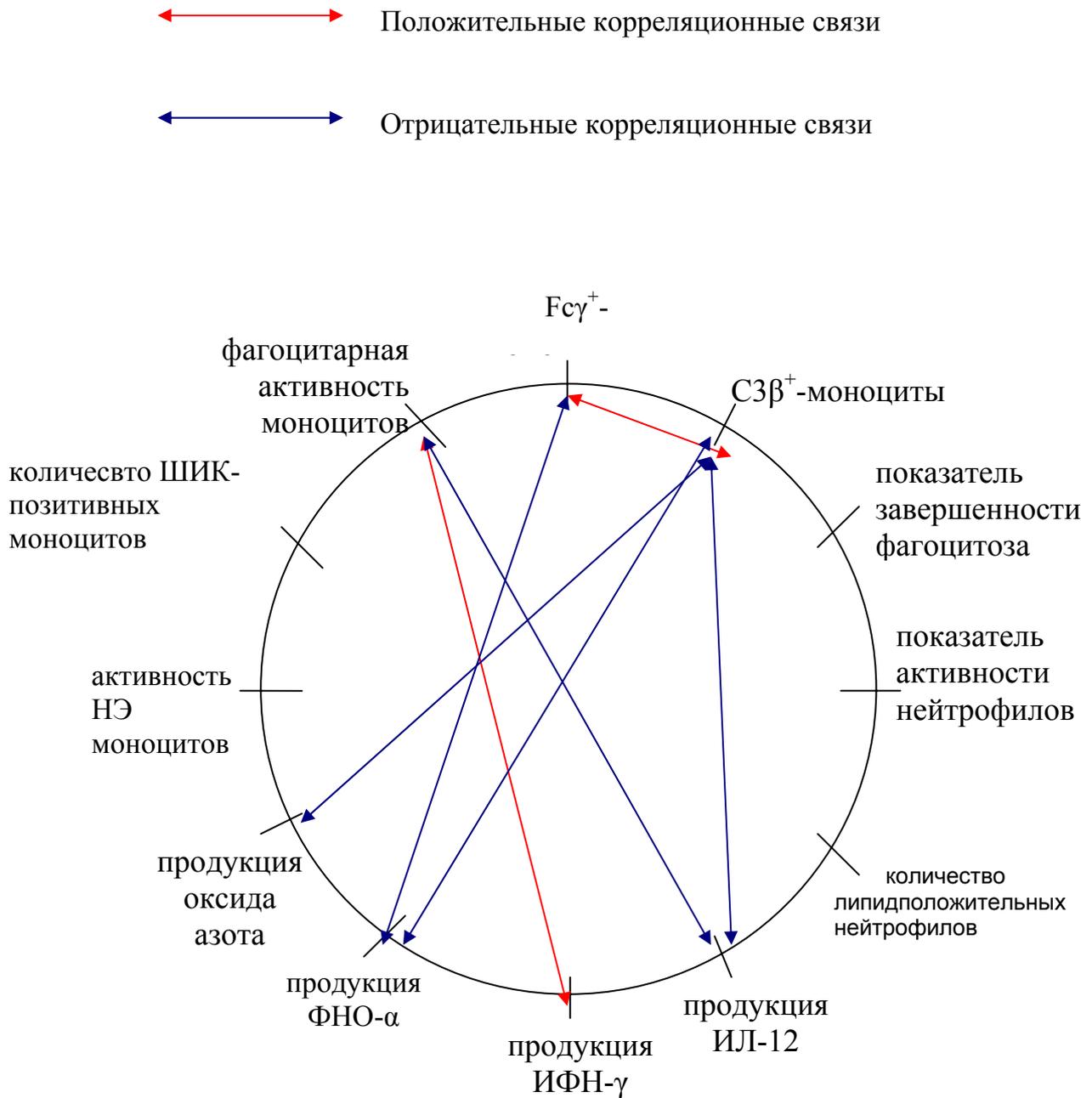


Рис. Функциональные связи между показателями у больных субклинической формой клещевого энцефалита

Современные исследования в области инфекционной иммунологии демонстрируют возможность дисрегуляции цитокиновой сети и модулируемых ею фагоцитарных реакций патогенными микроорганизмами [Фрейдлин И.С., 1995].

Проведенное нами исследование продукции цитокинов лейкоцитами периферической крови у больных лихорадочной формой КЭ (острое течение) выявило значительное увеличение по сравнению с аналогичными показателями в группе здоровых доноров продукции ИФН- γ (на 113 и 212% - соответственно базальной и стимулированной продукция, на 42% - индекса стимуляции) (табл. 4, рис. 11-13).

Значимость ИФН в противоинфекционной защите организма не вызывает сомнений: одна из их наиболее важных функций связана с их способностью индуцировать устойчивость организма к вирусным агентам [Girard M.T. et al., 1987; Бажан С.И., Белова О.Е., 1998; Tilg H. et al., 2002]. ИФН (как I, так и II типа) стимулируют фагоцитарную и противовирусную активность многих типов клеток, являясь одним из основных индукторов макрофагальной активации, придавая иммунокомпетентным клеткам цитотоксические свойства, необходимые для уничтожения вирусинфицированных клеток. Механизм действия ИФН- α/β и ИФН- γ проявляется и на стадии внутриклеточной репликации вируса и направлен на подавление сборки вирусных белков.

В настоящее время накоплено достаточно данных, позволяющих приблизиться к пониманию молекулярных механизмов индукции и противовирусного действия ИФН. Классическая схема регуляции индукции и действия интерферонов при вирусной инфекции включает ряд событий, приводящих к активации экспрессии специфических генов: синтезированный интерферон секретируется в межклеточное пространство, связывается с поверхностными рецепторами соседних клеток, вызывая активацию экспрессии так называемых ИФН-стимулируемых генов, продукты которых являются посредниками антивирусного и других биологических эффектов ИФН (рис. 14) [Samuel Sh.E., 2001].

Регуляторные взаимоотношения в системе вирус - ИФН имеют сложный характер. Показано, что транскрипция многих ИФН-стимулируемых генов может

прямо активироваться вирусами независимо от синтеза и действия ИФН. Так, для активации транскрипции ИФН-стимулируемых генов как самим интерфероном, так и вирусам необходимы регуляторные элементы ISRE, локализованные в промоторах этих генов. Однако для этих целей ИФН и вирусы используют различные биохимические механизмы.

ИФН-индуцируемый синтез и противовирусное действие олигоденилат-синтетазы, протеинкиназы и белков Mx опосредуются через активацию транскрипционного фактора ISGF3, связывающегося с последовательностями ISRE, локализованными в промоторных областях генов, кодирующих эти белки [Бажан С.И., Белова О.Е., 1998].

Посредниками же вирусиндуцируемой экспрессии ИФН-стимулируемых генов могут быть транскрипционные факторы IRF-1 и DRAF. Конститутивная экспрессия IRF-1 приводит к ИФН-независимой активации ИФН-стимулируемых генов и выраженной устойчивости к вирусной инфекции [Бажан С.И., Белова О.Е., 1998; Samuel Sh.E., 2001]. При этом прямая индукция этих генов вирусами способна обеспечить более быстрый клеточный ответ, чем их стимуляция через вирусиндуцированный ИФН, что может иметь решающее значение в развитии противовирусной резистентности на ранней стадии инфекции до того, как инфицированные клетки начнут синтезировать эндогенный ИФН.

Следовательно, логично сделать предположение о существовании различных альтернативных механизмов экспрессии генов в установлении противовирусной резистентности. Вместе с тем, по мнению С.И. Бажан и О.Е. Белова [1998], интерферон, по сравнению с вирусами, является более эффективным индуктором ИФН-стимулируемых генов.

Кроме того известно, что многие вирусы индуцируют специфические механизмы, позволяющие им преодолевать защитное действие ИФН. Несмотря на то, что в большинстве случаев олигоденилатсинтетаза, проинкиназа и белок Mx, по данным современной литературы, коррелируют с развитием противовирусной устойчивости, некоторые вирусы эволюционно выработали механизмы “ускользания”, позволяющие им преодолевать противовирусное действие ИФН (например, ингибирование экспрессии гена олигоденилатсинтетазы на транскрипционном уровне; формирование вторичных структур и конкурирование с

двухцепочечной РНК за связывание с протеинкиназой, предотвращая активацию последней в обработанных ИФН клетках; модуляция функции протеинкиназы клеточными белками, ингибирующими ее активность и субстратфосфорилирующую функцию) [Бажан С.И., Белова О.Е., 1998; Фрейдлин И.С., 1999].

Эти данные свидетельствуют о том, что вирусиндуцированное подавление вышеперечисленных функций может быть одним из механизмов, выполняющих важную роль в патогенезе вирусных инфекций.

Для индукции синтеза ИФН- γ клетками-продуцентами, например Th, необходимо сочетание двух сигналов: контакта с макрофагами через адгезивные молекулы и действия регуляторных цитокинов – ИЛ-12, ФНО- α , ИФН- β [Фрейдлин И.С., 1999].

У больных лихорадочной формой клещевого энцефалита базальная продукция мононуклеарными клетками ФНО- α увеличивалась (на 46% относительно “нормальных” значений), индекс стимуляции оказался сниженным и составлял 67% от такового у здоровых доноров (табл. 4, рис. 11, 13). Исследование способности мононуклеаров периферической крови у больных лихорадочной формой КЭ продуцировать ИЛ-12 не выявило изменения базального или стимулированного уровня его продукции, однако обнаружило уменьшение (на 30% по сравнению с таковым у здоровых людей) индекса стимуляции (табл. 4, рис. 11 - 13). Следует отметить, что в ответ на воспалительные стимулы одновременно с ИЛ-12, но в значительном избытке по сравнению с ИЛ-12, макрофагами продуцируются естественные его антагонисты p40 и его гемодимер (p40)₂, причем уровень их продукции достаточно продолжительное время остается высоким, в то время как уровень ИЛ-12 быстро снижается [Фрейдлин И.С., 1998]. Следует, на наш взгляд, особо подчеркнуть установленный нами факт регистрации у больных лихорадочной формой КЭ отрицательных корреляционных связей между продукцией ИФН- γ и ИЛ-12, что, возможно, свидетельствует о дисрегуляции цитокиновой продукции у больных с острым течением клещевого энцефалита.

Проблема латентного состояния разнообразных инфекций остается еще крайне мало исследованной, несмотря на свою научную и социальную значимость [Проскураков С.Я. и соавт., 2000].

Как показали результаты настоящего исследования у больных, страдающих субклинической и хронической формами клещевого энцефалита, увеличивалась как базальная (на 53 и 89 % по сравнению с нормой), так и стимулированная (на 31 и 65 % по сравнению с таковой у здоровых доноров, на 55 % у больных ХКЭ по сравнению с соответствующими значениями у больных с острой формой клещевого энцефалита) продукция ИЛ-12 мононуклеарными лейкоцитами периферической крови. При этом индекс стимуляции оставался в пределах нормы, превышая, однако, подобный показатель у лиц, страдающих лихорадочной формой КЭ (табл. 4, рис. 11 - 13).

Известно, что ИЛ-12 служит важнейшим связующим звеном между механизмами неспецифической защиты и специфическим иммунным ответом, являясь ключевым цитокином для усиления клеточно-опосредованного иммунного ответа и инициации эффективной противоинойфекционной защиты. Так, ИЛ-12 активирует пролиферацию, дифференцировку натуральных киллеров и Т-лимфоцитов, повышает их цитотоксическую активность и продукцию других цитокинов. Однако, в отличие от естественных киллеров, покоящиеся Т-хелперы-предшественники (Th_0) не экспрессируют рецепторы для ИЛ-12. Только после распознавания Т-клеточным рецептором комплекса антигенного пептида с молекулой главного комплекса гистосовместимости второго класса и связывания с костимулирующими молекулами на поверхности антигенпрезентирующей клетки происходит активация Th_0 : инициируется синтез ИЛ-2 и начинают экспрессироваться рецепторы для ИЛ-12. Активированные под влиянием ИЛ-12 Th_1 начинают продуцировать ИФН- γ , обуславливая ИФН- γ -зависимые протективные эффекты: Т-клеточную инфильтрацию, усиление экспрессии адгезивных молекул и продукцию хемокинов, активацию макрофагов (повышение микробицидности, противовирусной активности, экспрессии HLA II класса, Fc γ RI, секрецию супероксидных и нитроксидных радикалов, усиление дифференцировки и антигенпрезентирующей активности).

Нами было выявлено, что базальная продукция ИФН- γ у больных хроническим КЭ несколько увеличивалась относительно таковой у здоровых людей и у пациентов с бессимптомным хроническим вирусоносительством (табл. 4, рис. 11). Наряду с этим, стимулированная продукция, также как и функциональный

резерв продукции ФНО- α , ИФН- γ лейкоцитами периферической крови, у больных субклинической и хронической формой клещевого энцефалита снижались (табл. 4, рис. 12, 13).

Рецепторный аппарат макрофагов представляет важную характеристику опсонизирующей, хемотаксической и фагоцитарной способности клеток [Чередеев А.Н., 1999; Маянский А.Н., 1998; Тотолян А.А., Фрейдлин И.С., 2000]. Изучение функционального статуса моноцитов периферической крови у больных субклинической формой клещевого энцефалита показало увеличение по сравнению с аналогичными показателями у здоровых доноров как фагоцитарной активности моноцитов/макрофагов, так и уровня экспрессии моноцитарными клетками на поверхностной мембране Fc γ - и C3 β -рецептров (табл. 2, рис. 6).

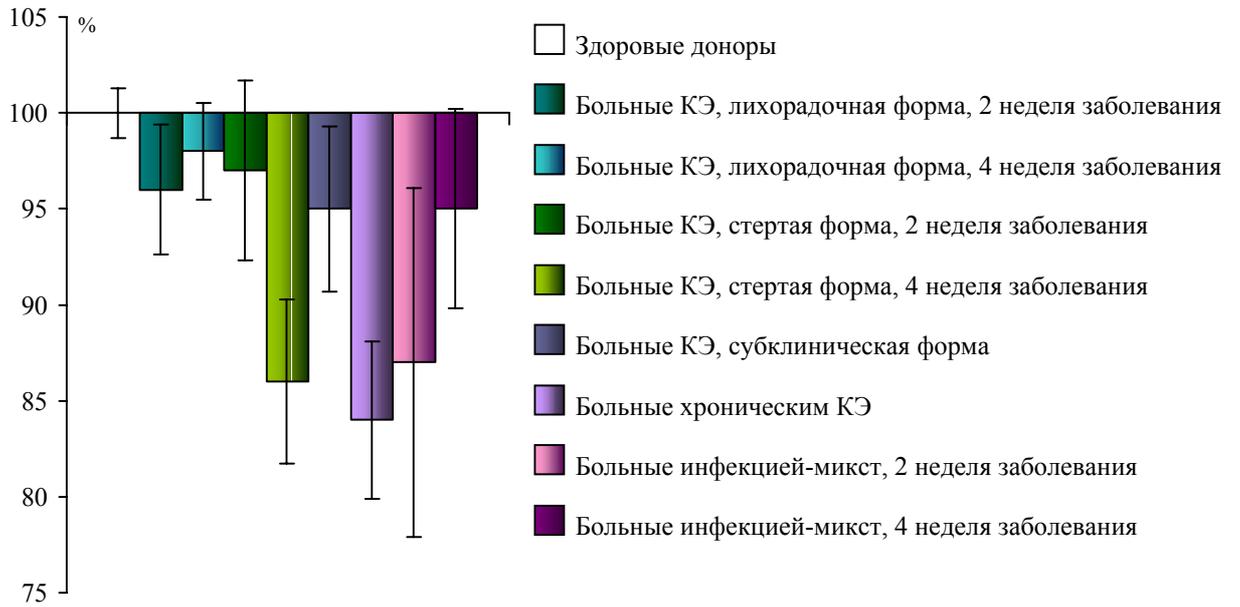
Фагоцитарная активность нейтрофильных гранулоцитов несколько увеличивалась, что выражалось в повышении (по сравнению с аналогичными значениями у здоровых доноров) поглотительной способности клеток (табл. 5, рис. 15). При этом в результате проведенных нами исследований были выявлены некоторые факты, свидетельствующие о снижении активности сегментоядерных нейтрофилов: уменьшение СЦК гидролаз и неферментных катионных белков (табл. 6, рис. 8, 9).

Согласно данным литературы, пониженная ферментативная активность лейкоцитов крови может являться следствием иммуносупрессорного влияния вирусов в результате вирусобусловленного блокирования клеточных генов, ответственных за синтез ферментов, повреждения или функциональной незрелости клеток [Жданов В.М., 1990, Фрейдлин И.С., 1984, 1999, 2001].

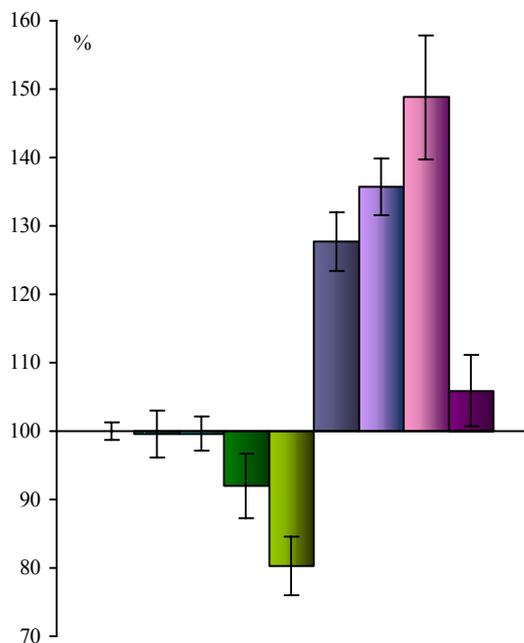
По данным В.М. Жданова [1990], установление латентной инфекции в организме характеризуется низкой интенсивностью метаболических процессов в клетках. И действительно, содержание гликогена и липидов как в нейтрофильных гранулоцитах, так и в моноцитарных клетках периферической крови у больных с хроническим бессимптомным вирусоносительством соответствовало содержанию указанных субстратов в клетках здоровых людей (табл. 3, 6, рис. 8, 9).

Своеобразие фагоцитарного статуса при бессимптомном течении КЭ, по всей видимости, можно объяснить различиями биологических свойств вируса, попавшего в организм человека. Вероятно, при скрытом течении маловирулентные

Показатель активности нейтрофильных гранулоцитов



Поглотительная способность
нейтрофильных гранулоцитов



Показатель завершенности
фагоцитоза

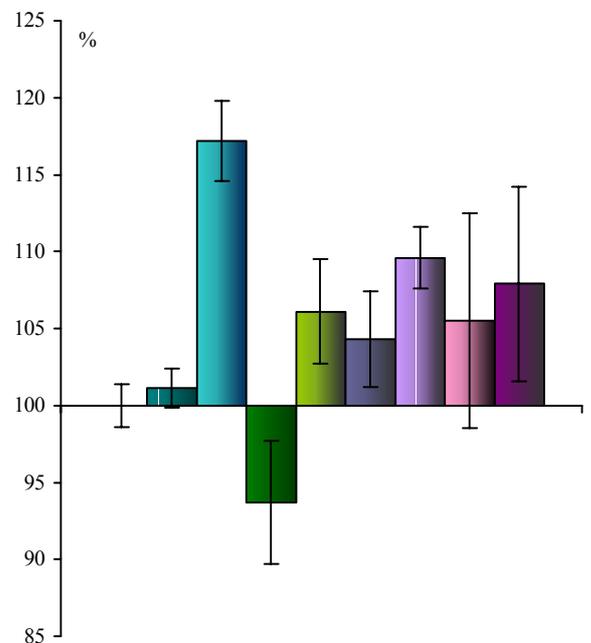


Рис. 15. Фагоцитарная активность нейтрофильных гранулоцитов периферической крови у больных клещевым энцефалитом и инфекцией-микст (по оси ординат – % от контрольных значений)

штаммы возбудителя накапливаются в клетках в небольших количествах в отличие от вируса с высокой вирулентностью, способного вызывать более выраженную антигенную стимуляцию.

По мнению С.Я. Проскурякова [2000], поддержание состояния покоя патогенов (вне гибели и репликации) связано с синтезом определенного количества NO^{\bullet} , выполняющего в данном случае роль метаболического регулятора.

Проведенное нами исследование способности мононуклеарных клеток периферической крови у больных с хроническим бессимптомным вирусносительством продуцировать оксид азота показало, что базальная продукция данного радикала не изменялась при сравнении с подобным показателем у здоровых людей, однако стимулированная продукция, также как и резервные возможности клеток секретировать NO^{\bullet} , несколько снижались (табл. 4, рис. 11 - 13).

При оценке состояния бактерицидного профиля у больных хроническим клещевым энцефалитом было обнаружено отчетливое угнетение как кислороднезависимых, так и кислородзависимых систем мононуклеарных фагоцитов. Миелопероксидазная активность моноцитов практически не определялась (табл. 3, рис. 8), выявляя неполноценность оксидазной системы фагоцитов, следствием чего может явиться развитие хронического рецидивирующего процесса [Рябинченко Е.В. и соавт., 2000]. Базальный синтез оксида азота лейкоцитами периферической крови у больных ХКЭ оказался сопоставимым с аналогичным у здоровых доноров (табл. 4, рис. 11). В то же время известно, что физиологические концентрации радикала, индуцируемые sNOs , оказываются недостаточными для реализации противоинойфекционной защиты клеток; токсические для инфекционных агентов дозы оксида азота вырабатываются только активированными макрофагами [Barker J.E. et al., 1998; Бондаренко В.М., 1999]. Однако введение в питательную среду ЛПС не приводило к активации синтеза NO^{\bullet} . Напротив, стимулированная продукция оксида азота, также как и резервные возможности продуцировать данный радикал, у больных хроническим КЭ снижались на 77% и 74% соответственно по сравнению с “нормальными” значениями и на 30% и 25% соответственно по сравнению с подобными

показателями у больных с хроническим бессимптомным вирусоносительством (табл. 4, рис. 12, 13).

Исследование корреляционных связей между исследованными цитокинами и оксидом азота позволило выявить отрицательные зависимости между продукцией ИЛ-12 и NO^* , что укладывается в представление о негативном пути регуляции синтеза iNOs при повышении продукции ИЛ-12 (рис. 16) [Проскураков С.Я. и соавт., 2000]. Однако отрицательная функциональная связь между секрецией изучаемого радикала и продукцией ИФН- γ свидетельствует об изменении, видимо, вследствие персистенции ВКЭ в мононуклеарных клетках, цитокиновой регуляции секреции радикала (рис. 16).

При исследовании функционального статуса моноцитарных клеток периферической крови у больных ХКЭ нами было выявлено угнетение фагоцитарной активности моноцитов/макрофагов по сравнению с аналогичным показателем у здоровых людей, больных острыми формами клещевого энцефалита и пациентов с хроническим бессимптомным вирусоносительством (табл. 2, рис. 6). В то же время изучение рецепторного аппарата моноцитов показало увеличение относительного количества $\text{Fc}\gamma^+$ -экспрессирующих моноцитов/макрофагов (табл. 2, рис. 6). Возможно, в периферической крови у больных хроническим клещевым энцефалитом циркулирует моноцитарная популяция со сниженной фагоцитарной активностью, экспрессирующая на своей поверхности филогенетически более ранние $\text{Fc}\gamma$ -рецепторы, что может обуславливаться индуцированной ВКЭ-антигенной стимуляцией пролиферации промоноцитов и выходом незрелых моноцитов в кровеносное русло [Лукина Е.А. и соавт., 2000; Тотолян А.А., Фрейдлин И.С., 1999]. Кроме того, по данным А.Н. Чередыева [1995], выявленные изменения могут быть связаны с избирательной утратой части $\text{C3}\beta$ -рецепторов вследствие длительной персистенции вируса и компенсаторной активацией экспрессии $\text{Fc}\gamma$ -рецепторов.

Исследование фагоцитарного статуса полиморфноядерных лейкоцитов периферической крови у больных хроническим клещевым энцефалитом выявило некоторое угнетение активности щелочной фосфатазы (в 1,4 раза), СЦК НКБ (в 1,1 раза) и увеличение (в 1,2 раза) активности кислой фосфатазы (табл. 6, рис. 9). Следует отметить, на наш взгляд, разнонаправленное изменение показателей, хара-

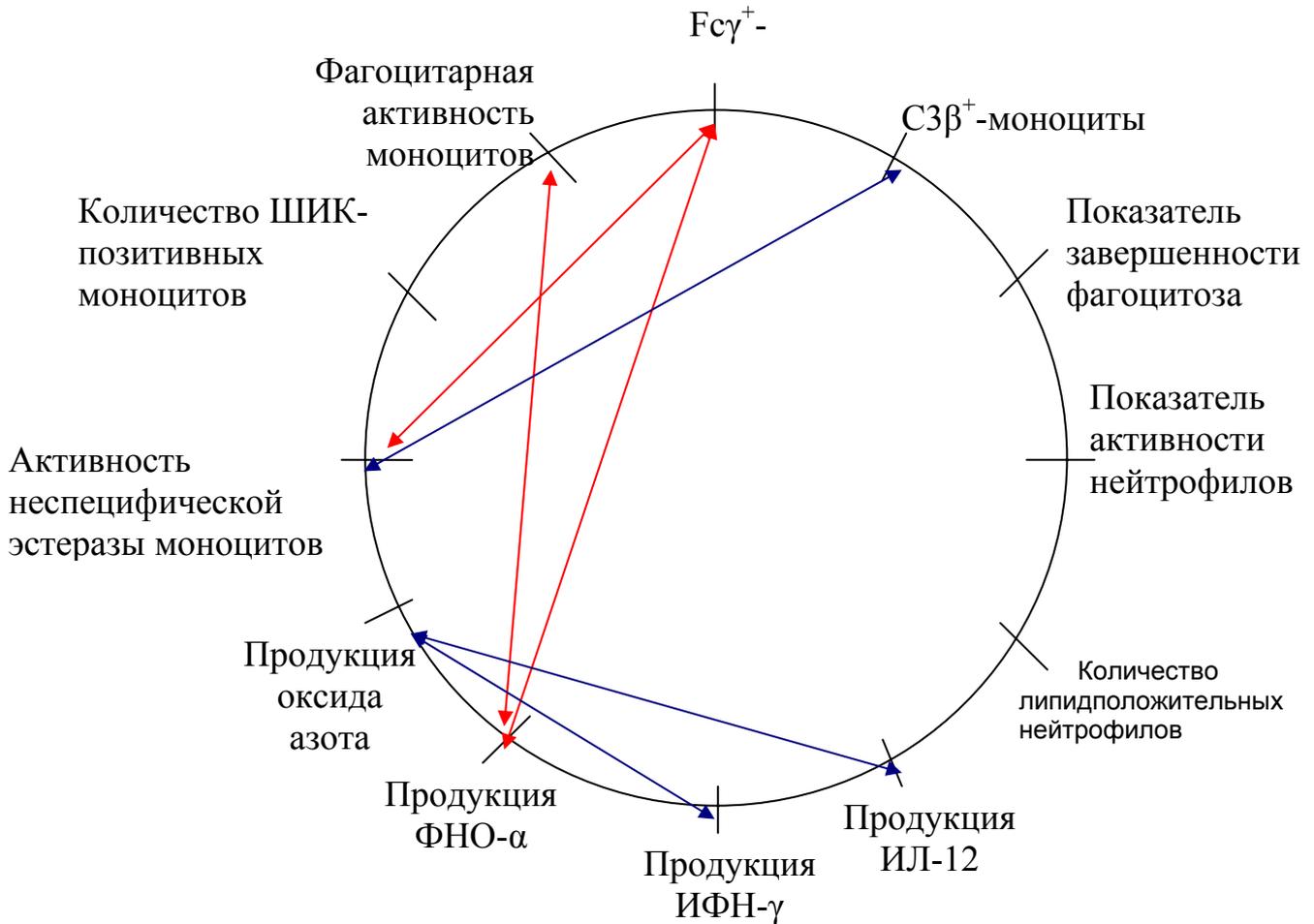
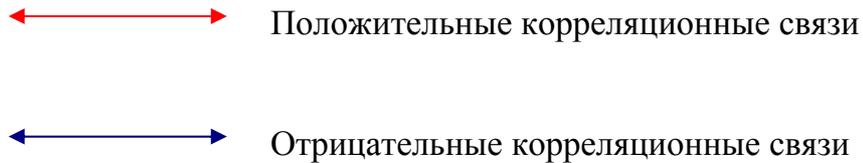


Рис. 16. Функциональные связи между показателями фагоцитарного статуса лейкоцитарных клеток крови у больных хроническим клещевым энцефалитом.

ктеризующих фагоцитарную активность нейтрофильных гранулоцитов: уменьшение по сравнению с “контрольными” значениями показателя активности клеток при увеличении их поглотительной и переваривающей способности (табл. 5, рис. 15).

Вероятно, данный факт объясняется преимущественно активирующим влиянием на фагоцитарные функции сегментоядерных нейтрофилов (в основном, усилении кислородзависимых механизмов микробицидности – в 2,4 раза по сравнению с таковым у здоровых доноров) как длительной антигенной стимуляции, так и тем цитокиновым фоном, который определяется хронической персистенцией ВКЭ.

Таким образом, одним из механизмов угнетения фагоцитарной активности макрофагов у больных хроническим клещевым энцефалитом, также как и подавление секреции цитокинов, может быть обусловлено увеличенной продукцией играющих роль негативного звена цитокиновой регуляции функциональной активности макрофагов ТФР- β , ИЛ-6, ИЛ-10, накопление которых происходит при длительной персистенции вируса в организме [Dinarello C., 1994; Подымов С.Д., 2002]. Кроме того, подавление активности клеток в процессе развития инфекции может быть обусловлено изменением синтеза и рецепции цитокинов, что в конечном итоге приводит к нарушению реализации клетками фагоцитарной функции.

Механизмы вызванных патологическим действием вирусных агентов нарушений системы цитокиновой регуляции активности клеток, обуславливающих высокую устойчивость внутриклеточных паразитов к микробицидному действию макрофагов, могут быть различны [Schreurs J. et al., 1993; Фрейдлин И.С., 1995]. Снижение фагоцитарных функций макрофагов может быть опосредовано не только индукцией возбудителем синтеза ингибирующих цитокинов, но и блокирующим действием патогенов на механизмы внутриклеточной трансдукции полученных от цитокинов сигналов активации: на процессы фосфорилирования клеточных белков, липидов, на активность протеаз цистеина, тирозина, протеинкиназы С, на Ca^{2+} -зависимый путь передачи сигналов. При этом макрофаг утрачивает способность отвечать адекватной активацией функций на цитокиновую стимуляцию [Reiner N., 1994; Ляшенко В.А., 1995; Фрейдлин И.С., 1995; Biswas S.K., Sodhi A., 2002; Hu B. et al., 2002; Kant A.M. et al., 2002; Myers J.T., Swanson J.A., 2002; Sordet O. et al., 2002].

Особо следует отметить, что с иксодовыми клещами связаны существование и передача человеку возбудителей ряда инфекционных заболеваний различной этиологии. Как только выяснилось, что патогенные боррелии и вирус клещевого энцефалита имеют в Евразии одинаковых основных переносчиков, которые определяют возможность совместимой циркуляции и сходство ареалов этих возбудителей, стало понятно, что должно иметь место одновременное заражение людей данными агентами [Коренберг Э.И., 2001].

Заключение о наличии микст-заболевания при отсутствии патогномичных признаков одной или одновременно двух инфекций делают, как правило, по результатам серологических исследований. При этом важно не смешивать такие случаи с присоединяющимися инфекциями: только достоверное нарастание титров антител к возбудителям при стойкой клинической симптоматике может служить подтверждением протекающим ассоциированным заболеваниям [Коренберг Э.И., 2001].

В настоящее время известно, что у пациентов с боррелиозно-энцефалитной инфекцией-микст чаще, чем при КЭ, наблюдаются различные проявления общеинфекционного синдрома и происходят более существенные изменения в антиоксидантной системе организма, чем у больных изолированным клещевым энцефалитом или иксодовым клещевым боррелиозом [Лобзин Ю.В. и соавт., 2000].

Нужно отметить, что взаимоотношения различных возбудителей при смешанной инфекции в организме-хозяине и влияние этих взаимоотношений на характер изменения неспецифической резистентности организма и иммунной системы изучены крайне мало. Имеющиеся в литературе данные позволяют заключить, что сочетание различных возбудителей в организме или неодинаковый уровень антигенной стимуляции с разницей в интервалах между получаемыми дозами возбудителей могут вызывать различное, иногда даже разнонаправленное действие [Коренберг Э.И., 2001]. Особо важное значение имеет состояние иммунной системы организма, причем смешанное инфицирование способно привести как к активации, так и к подавлению его защитных механизмов [Алексеев А.Н., 1993; Коренберг Э.И., 2001].

Проведенные нами исследования фагоцитарного статуса мононуклеарных лейкоцитов периферической крови у пациентов, страдающих хроническим иксодовым клещевым боррелиозом, ассоциированным с лихорадочной формой клещевого энцефалита, позволили выявить достоверное по сравнению с аналогичными показателями у здоровых людей снижение относительного количества $C3\beta$ -экспрессирующих моноцитарных клеток как на 2-ой, так и на 4-ой неделе заболевания (табл. 2, рис. 6). При этом фагоцитарная способность моноцитов/макрофагов периферической крови у больных

инфекцией-микст снижалась как относительно значений подобного параметра у здоровых доноров, так и относительно пациентов с лихорадочной формой клещевого энцефалита, обследованных в те же сроки заболевания (табл. 2, рис. 6). Активность неспецифической эстеразы угнеталась по сравнению с “нормальными” значениями и соответствующими параметрами у больных КЭ у пациентов данной группы, обследованных на 2-ой неделе заболевания, миелопероксидазы – на 4-ой неделе заболевания. Данные факты свидетельствуют о более выраженном угнетении активности моноцитарно-макрофагального звена неспецифической резистентности организма при сочетанном заражении иксодовым клещевым боррелиозом и клещевым энцефалитом.

Оксид азота определяется как полифункциональная молекула, одним из свойств которой является выраженное противовирусное действие, определяющееся подавляющим эффектом NO^\bullet на процессы репликации вирусной РНК, белкового синтеза и выхода вириона из макрофагальных клеток [Lin Y.L. et al., 1997]. Некоторые авторы отмечают особо способность NO^\bullet легко распространяться между клетками и проникать внутрь их, независимость его эффектов от приобретенных иммунных реакций [Nathan C., 1992; Кагуріаh T.R. et al., 1993]. Вызывает интерес стимуляция под действием оксида азота такого компонента антипатогенной активации фагоцитов, как протеазы из семейства каспаз. Эти белки принимают участие в гибели клеток, индуцируя ДНК-зависимые протеинкиназы, фактор фрагментации ДНК и, возможно, сериновые протеиназы. Кроме того, по данным С.Я. Проскурякова и соавт. [2000], NO^\bullet играет важную роль в индукции апоптоза инфицированных фагоцитирующих клеток и изменение экспрессии его является эффективным адаптивным механизмом для удаления благоприятной для репликации вируса внутриклеточной среды без индукции повреждения окружающих тканей. Имеющиеся в современной литературе данные свидетельствуют о разнонаправленном изменении продукции NO^\bullet при флавивирусных инфекциях в зависимости от уровня и типа антигенной стимуляции [Проскуряков С.Я., 2000].

При этом рядом авторов показано, что сочетанное поражение мононуклеарных клеток агентами бактериальной и вирусной этиологии модулирует секрецию вирусинфицированными макрофагами цитокинов, что может свидетельствовать об изменении патогенеза заболевания при присоединении конкурентной бактериальной инфекции [Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 2000; Chen YC, Wong SY., 2002].

Вместе с тем, несмотря на данные литературы о том, что преобладающим типом ответа на инфекцию является экспрессия $i\text{NOs}$ и последующая продукция NO^\bullet и других высокоактивных соединений азота в клетках-хозяевах, проведенное нами исследование

способности мононуклеарных клеток периферической крови у больных инфекцией-микст (аналогично с больными острыми и хроническими формами клещевого энцефалита) выявило снижение продукции исследуемого радикала (рис. 11 - 13).

Возможно, снижение синтеза NO^* , как эффектора антипатогенной защиты, является для ВКЭ одним из механизмов ускользания от иммунологического надзора, способствуя тем самым длительной персистенции в организме и развитию основных звеньев патогенеза заболевания.

Исследование цитокинового паттерна лейкоцитов периферической крови у больных острым клещевым энцефалитом, ассоциированным с хронической боррелиозной инфекцией, позволило выявить угнетение способности клеток продуцировать провоспалительные цитокины, выражающееся в ингибции секреции мононуклеарными клетками ИЛ-12, ФНО- α , ИФН- γ (табл. 4, рис. 11 - 13). Возможно данное обстоятельство обусловлено активной продукцией в результате хронической персистенции в организме боррелий ряда противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-10), являющихся функциональными антагонистами исследуемых нами цитокинов.

Приведенные данные свидетельствуют о сложной структуре системы цитокинов, напоминающих плотную сеть многочисленных компонентов, взаимосвязанных на различных уровнях. Воздействие на любое звено этой сети неизбежно приводит в движение всю систему и сказывается на других ее звеньях [Ярилин А.А., 1997].

Метаболизм нейтрофильных гранулоцитов периферической крови характеризуется в нормальных условиях крайне низким уровнем процессов ассимиляции и диссимиляции, а в очаге воспаления – преобладанием диссимиляции [Маянский А.Н., 1998].

Фагоцитарная активность нейтрофилов оценивалась нами в реакции бактериального фагоцитоза, в результате которой оказалось, что у больных инфекцией-микст, обследованных на 2-ой неделе заболевания, снижался показатель активности нейтрофильных гранулоцитов, однако поглотительная способность клеток при этом увеличивалась относительно такового у здоровых людей и больных лихорадочной формой клещевого энцефалита (табл. 5, рис. 15).

Цитохимическое исследование сегментоядерных нейтрофилов периферической крови у больных сочетанной инфекцией выявило однонаправленное с соответствующими показателями у больных с лихорадочной

формой клещевого энцефалита изменение активности гидролаз, степень выраженности которой, однако, была менее значимой (табл. 6, рис. 9). Активность миелопероксидазы нейтрофильных гранулоцитов и содержание гликогена и липидов оказались сопоставимыми с соответствующими показателями у здоровых людей (табл. 6, рис. 9), что в целом свидетельствует о незначительном изменении фагоцитарного статуса нейтрофильного звена фагоцитарной системы периферической крови у больных иксодовым клещевым боррелиозом, ассоциированным с острым клещевым энцефалитом.

Таким образом, от типа взаимоотношений, сложившихся между компонентами ассоциации в ходе инфекционного процесса зависит не только то, какой агент будет доминировать и по какому типу будет развиваться клиническая картина заболевания, но и главным образом характер межклеточной кооперации при активации факторов неспецифической резистентности организма и модуляция типа иммунного ответа. Не вызывает сомнения, что ассоциация патогенов кардинально изменяет форму и структуру инфекционного процесса, при этом патогены - участники сочетанной инфекции – способны изменять также и собственные свойства, органный и клеточный тропизм в результате различных мутаций. Взаимодействуя, ассоцианты способны преодолевать барьер естественной резистентности организма к определенным видам патогенов и депрессивно воздействовать на иммунную систему организма.

ВЫВОДЫ

1. У больных клещевым энцефалитом и иксодовым клещевым боррелиозом, ассоциированным с клещевым энцефалитом, на фоне проводимой терапии возникают выраженные нарушения фагоцитарной, секреторной, бактерицидной и метаболической функций моно- и полиморфноядерных фагоцитов периферической крови.
2. Функциональные и метаболические изменения фагоцитов периферической крови у больных с острыми и хроническими формами клещевого энцефалита имеют однонаправленный характер, при этом особенно выражены при остром течении вирусной моноинфекции.
3. При ассоциации бактериальной и вирусной инфекции наиболее угнетаются резервные и цитокинпродуцирующие возможности мононуклеарных клеток периферической крови.
4. Механизмы изменения фагоцитарной функции лейкоцитов периферической крови при острых формах клещевого энцефалита связаны с нарушением экспрессии рецепторного аппарата, продукции оксида азота и иммуноцитокинов. Поддержание относительной стабильности фагоцитарных функций нейтрофильных гранулоцитов на фоне депрессии их ферментативной активности во многом обуславливается компенсаторным повышением продукции активных форм кислорода.
5. Несостоятельность фагоцитарных способностей мононуклеаров крови на фоне повышенной экспрессии цитоплазматических рецепторов у больных хроническим клещевым энцефалитом связана с глубоким угнетением возможностей инфицированных клеток продуцировать провоспалительные цитокины.
6. Дефект моноцитарно/макрофагального звена иммунитета при ассоциированной инфекции обуславливается сочетанным подавлением экспрессии рецепторов, показателя фагоцитоза и продукции иммуноцитокинов.