

Особенности продукции цитокинов при хронизации иксодового клещевого боррелиоза

Бараулина А.С., Кологривова Е.Н., Жукова О.Б., Чечина О.Е.

Characteristics of production cytokines in patients with development of chronic tick-borne borreliosis

Baraulina A.S., Kologrivova Ye.N., Zhukova O.B., Chechina O.Ye.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Бараулина А.С., Кологривова Е.Н., Жукова О.Б., Чечина О.Е.

С целью выявления особенностей цитокинопродукции у пациентов с хронизацией иксодового клещевого боррелиоза в супернатантах трехсуточных культур цельной крови проведена оценка спонтанной, стимулированной фитогемагглютинином и антигеном боррелий продукции интерлейкина-4, интерферона- γ и трансформирующего ростового фактора- β 1. Высокий риск хронизации иксодового клещевого боррелиоза сопряжен с интенсивной спонтанной и антигенстимулированной продукцией интерферона- γ и трансформирующего ростового фактора- β 1 в остром периоде заболевания.

Ключевые слова: иксодовый клещевой боррелиоз, интерлейкин-4, интерферон- γ , трансформирующий ростовой фактор- β 1.

For detection of cytokine production features in patients with development of chronic tick-borne borreliosis the evaluation of spontaneous, fitohaemagglutinin-stimulated and stimulated with antigen of borrelia cytokine production was conducted in supernatants of three-day blood cells cultures. High risk of development of chronic tick-borne borreliosis associated with intensive spontaneous and antigen-stimulated production of interferon- γ and transforming growing factor- β 1 in acute disease.

Key words: tick-borne borreliosis, interleukin-4, interferon- γ , transforming growing factor- β 1.

УДК 578.245:616.98-002.2:579.834.114:595.421

Введение

Иксодовые клещевые боррелиозы (ИКБ) — группа инфекционных трансмиссивных заболеваний, вызываемых бактериями рода *Borrelia* и передающихся иксодовыми клещами [1, 7]. Заболевание отличается повсеместной распространенностью, полиморфизмом клинических проявлений, высокой частотой (до 60%) формирования хронического течения с поражением различных органов и систем и последующей инвалидизацией. Одним из характерных симптомов острого ИКБ является мигрирующая эритема, которая отражает активацию неспецифического звена иммунитета [2, 5, 7, 9]. В последние годы возросло количество пациентов с безэритемной (труднодиагностируемой) формой заболевания. Хроническое течение боррелиоза при безэритемной форме формируется значительно чаще, чем при эритемной [7, 9].

Известно, что иммунная система принимает непосредственное участие не только в элиминации патогена, но и в развитии осложнений основного заболевания. Хроническое течение ИКБ сопровождается системными аутоиммунными расстройствами с развитием Лайм-артрита, хронического атрофического акродерматита, менингоэнцефалита [1, 7, 9]. Отмена аутоотолерантности так же, как и отсутствие адекватного иммунного ответа на патоген, возможна вследствие нарушения механизмов цитокиновой регуляции [10].

Интерлейкину-4 (ИЛ-4), основными продуцентами которого являются Т-хелперы типа 2 (Th2), принадлежит ключевая роль в формировании гуморального иммунного ответа. В развитии клеточно-опосредованных иммунных реакций основная регуляторная функция отводится интерферону- γ (ИФН- γ) [4, 10].

В настоящее время показано, что формирование иммунного ответа по смешанному Th1—Th2 типу или с преобладанием Т-хелперов типа 1 (Th1) характерно для более легкого течения ИКБ [8, 10]. Однако активация преимущественно Th1-пути не является гарантией благоприятного исхода заболевания. Нарушения клеточного звена иммунитета играют существенную роль в развитии Лайм-артрита, неврологических и кожных осложнений. У пациентов с хроническим течением ИКБ выявлена сенсibilизация Т-лимфоцитов к антигенам нервных тканей, синовиальной оболочки, кардиолипину [12, 14, 17, 20]. Поддержание аутолепрантности осуществляется CD4⁺CD25⁺-клетками (Treg), основными продуцентами иммуносупрессорных цитокинов, в частности трансформирующего ростового фактора-β1 (ТРФ-β1) [12, 18].

С учетом широкого распространения ИКБ, частого развития хронической формы и высокого риска формирования аутоиммунных осложнений возникает необходимость исследования механизмов иммунологических нарушений при данной инфекционной патологии.

Целью исследования явилась оценка роли изменения продукции цитокинов (ИЛ-4, ИФН-γ, ТРФ-β1) в хронизации ИКБ.

Материал и методы

В программу исследования был включен 41 пациент (23 женщины, 18 мужчин) в возрасте от 18 до 50 лет с различной продолжительностью течения ИКБ: 23 — с хроническим и 18 — с острым течением.

Диагноз «острый ИКБ» устанавливали на основании положительного эпидемиологического анамнеза (пребывание в лесу, на дачном участке, присасывание клеща), наличия типичной клинической картины (головные боли, боли в крупных и мелких суставах, повышение температуры, астенический синдром), а также выявления специфических антител к боррелиям (иммуноглобулин М (IgM)) методом иммуноферментного анализа (ИФА). У всех пациентов с острым ИКБ была зарегистрирована безэритемная форма заболевания. Диагноз хронического ИКБ верифицировали на основании продолжительности вышеуказанных клинических проявлений в течение 6 мес и более, а также факта обнаружения противоборрелиозных антител (IgM, IgG) в ИФА.

Обследование проводили однократно на 1-й нед госпитализации до начала этиопатогенетической и иммуотропной терапии. Пациенты с острым ИКБ в дальнейшем наблюдались амбулаторно в течение 6 мес и по результатам наблюдения были разделены на две подгруппы: с выздоровлением после курса проведенной терапии (10 человек) и с хронизацией острого ИКБ (8 человек). Контрольную группу составили 25 условно здоровых добровольцев с соответствующими характеристиками по полу и возрасту, отрицавших факт присасывания клеща в течение жизни. Как у здоровых доноров, так и у пациентов с ИКБ на момент обследования были исключены острые воспалительные заболевания, обострения хронических заболеваний, применение иммуотропной терапии, вакцинация в течение предшествующего обследованию месяца.

В качестве материала исследования использовали периферическую кровь, которую забирали утром натощак из локтевой вены. Клетки крови культивировали в течение 3 сут в среде RPMI-1640 («Вектор-Бест», г. Новосибирск), содержащей 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (ICN Biomedical, США), 100 мкг/мл гентамицина, 0,3 мг/мл L-глутамина, 2 ммоль/мл HEPES (Flow, Великобритания). Проводили культивирование клеток в отсутствие митогенов, а также на фоне стимуляции фитогемагглютинином (ФГА) (Sigma, США) в концентрации 10 мкг/мл и боррелиозным антигеном — ультразвуковым лизатом *Borrelia garinii* в дозе $1,25 \cdot 10^6$ микробных клеток в 1 мл (антиген предоставлен ФГУП «НПО „Микроген“» МЗ РФ НПО «Вирион»). Культура *Borrelia garinii* выделена из клещей, собранных на территории Томской области.

Методом ИФА в супернатанте культуры клеток цельной крови определяли концентрации ИЛ-4, ИФН-γ (Pro Con, г. Санкт-Петербург) и ТРФ-β1 (Biosource, США). Анализ проводили на микропланшетном фотометре Multiscan EX (Labsystems, Финляндия). Расчет концентрации цитокинов осуществляли по калибровочной кривой. Статистическую обработку результатов исследования выполняли с помощью пакета программ Statistica 6.0. Результаты представлены в виде медианы *Me*, значений 25-го и 75-го перцентилей (Q_1 и Q_3 соответственно). Для оценки значимости статистических различий использовали непараметрические критерии Вилкоксона для зависимых показателей

и Манна—Уитни для независимых выборок. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Известно, что ИФН- γ продуцируется активированными Th1-лимфоцитами и является одним из ключевых цитокинов клеточного ответа [10]. С учетом способности боррелий к внутриклеточному паразитированию и формированию иммунного ответа по Т-клеточному пути ИФН- γ был выбран в качестве маркера активации Th1-субпопуляции лимфоцитов. Уровень спонтанной продукции ИФН- γ у всех пациентов с ИКБ превышал аналогичный показатель здоровых доноров, при этом ответ на ФГА регистрировался на достоверно низком уровне по сравнению с контрольной группой (таблица). Имеются данные о том, что воздействие антигенов боррелий на Т-лимфоциты приводит к повышению продукции ими ИФН- γ [10, 11]. Эти сведения согласуются с полученными результатами исследования спонтанной продукции ИФН- γ , отражающей цитокинпродуцирующую способность клеток, находящихся в активированном состоянии в момент взятия крови.

Отсутствие реакции клеток крови на ФГА у всех пациентов с ИКБ может быть обусловлено циркулированием в крови большого количества преактивированных антиген-специфических Th1-лимфоцитов, для которых наиболее сильным стимулятором продукции ИФН- γ является боррелиозный антиген [11]. Антигенстимулированная продукция ИФН- γ у пациентов с хроническим ИКБ оказалась ниже аналогичного показателя в контроле, что свидетельствует об ослаблении влияния Th1-пути на фоне хронического течения инфекционного процесса. При хронизации остро ИКБ отмечен максимальный уровень антиген-специфической продукции ИФН- γ . У больных острым ИКБ с последующим выздоровлением исследуемый показатель регистрировался на уровне значений, выявленных у пациентов с хроническим течением ИКБ (таблица). Таким образом, интенсивная продукция ИФН- γ в ответ на антиген боррелий в острый период ИКБ, связанная, вероятно, с усиленной антиген-специфической активацией Т-клеточного звена иммунитета, не приводит к эффективной элиминации патогена.

Продукция цитокинов у пациентов с различной продолжительностью течения иксодового клещевого боррелиоза ($Me (Q_1; Q_3)$)

Уровень цитокинов в супернатантах культуры клеток крови, пг/мл		Характеристика обследованных			
		Здоровые доноры	Пациенты с хроническим ИКБ	Пациенты с острым ИКБ с последующим выздоровлением	Пациенты с острым ИКБ с последующей хронизацией
ИФН- γ	спонтанный	0 (0,00; 0,00)	87,65 (75,37; 124,30) $p_2 < 0,01$	38,17 (38,17; 50,00) $p_2 = 0,040$ $p_3 < 0,01$	87,83 (87,83; 150,50) $p_2 = 0,040$ $p_4 = 0,035$
	ФГА-стимулированный	412,40 (265,00; 47,92) $p_1 = 0,023$	68,99 (50,00; 99,84) $p_2 < 0,01$	50,00 (27,35; 75,30) $p_2 = 0,048$	56,15 (50,00; 62,30) $p_2 = 0,030$
	антигенстимулированный	217,10 (100,20; 239,90) $p_1 = 0,023$	87,65 (50,00; 112,00) $p_2 = 0,035$	100,00 (50,00; 112,00)	300,50 (112,00; 489,00) $p_3 = 0,034$
ИЛ-4	спонтанный	12,96 (10,89; 12,96)	29,42 (28,32; 35,00) $p_2 < 0,01$	9,11 (7,60 ; 10,90) $p_3 < 0,01$	15,37 (9,11; 40,00)
	ФГА-стимулированный	21,39 (18,16; 21,39)	33,89 (15,37; 69,28)	12,96 (10,89; 18,16) $p_3 = 0,015$	18,16 (12,96; 25,12)
	антигенстимулированный	10,46 (7,96; 14,18)	21,39 (10,89; 34,35)	15,37 (15,37; 21,39) $p_2 < 0,01$	15,37 (7,60; 21,39) $p_2 = 0,017$
ТРФ- β 1	спонтанный	62,50 (31,23; 62,50)	62,30 (31,20; 62,50)	21,78 (21,78; 62,50)	86,26 (31,20; 125,00)
	ФГА-стимулированный	105,60 (62,50; 125,00)	62,50 (31,20; 125,00)	73,39 (21,78; 125,00)	31,20 (21,78; 62,50)
	антигенстимулированный	44,55	125,00	31,20	86,26

	(38,02; 125,00)	(86,26; 125,00) $p_1 = 0,047$	(31,00; 31,20)	(15,20; 86,26)
--	-----------------	----------------------------------	----------------	----------------

Примечание. Уровень p указан для выборок, имеющих достоверные различия; p_1 — уровень статистической значимости различий по сравнению со спонтанным уровнем цитокинопродукции; p_2 — уровень статистической значимости различий по сравнению с аналогичными показателями у здоровых доноров; p_3 — уровень статистической значимости различий по сравнению с аналогичными показателями у пациентов с хроническим ИКБ; p_4 — уровень статистической значимости различий по сравнению с аналогичными показателями у пациентов с острым ИКБ с последующим выздоровлением.

При исследовании спонтанной продукции ИЛ-4, ключевого цитокина Th2-пути, выявлено, что наиболее высокие значения данного показателя были у пациентов с хроническим течением ИКБ (см. таблицу). При этом у больных с последующей хронизацией инфекционного процесса не отмечено значимых различий при сравнении уровня спонтанной продукции ИЛ-4 со значениями, полученными у пациентов с хронической формой заболевания, что может выступать отражением высокой активации антиген-неспецифических Th2-клеток. Цитокиновый ответ на ФГА отсутствовал у всех обследованных лиц с ИКБ (см. таблицу).

Антигенстимулированная продукция ИЛ-4 у всех пациентов с острым ИКБ была достоверно выше контрольных значений данного показателя, что, вероятно, является отражением активного вовлечения Th2-пути в противоборрелиозный иммунный ответ в остром периоде болезни (см. таблицу). У пациентов с последующей хронизацией инфекционного процесса продукция ИЛ-4 в ответ на антиген боррелий находилась на одном уровне со спонтанной. Указанные особенности, с одной стороны, позволяют предположить, что спонтанная продукция ИЛ-4 у пациентов с высоким риском хронизации ИКБ осуществляется преимущественно активированными антиген-специфическими Th2-лимфоцитами, а с другой — свидетельствуют о снижении функциональных возможностей антиген-специфического гуморального иммунного ответа на фоне интенсивной неспецифической активации Th2-лимфоцитов.

В качестве показателя активности Treg была исследована способность клеток крови продуцировать ТРФ-β1, являющийся одним из важнейших супрессорных цитокинов [3]. Спонтанная продукция ТРФ-β1 у пациентов с хроническим течением ИКБ регистрировалась на одном уровне с аналогичным показателем у здоровых доноров (см. таблицу). При этом достоверных различий с уровнем продукции этого цитокина у пациентов с острым течением ИКБ не выявлено. Цитокиновый ответ на ФГА отсутствовал у всех обследованных. В присутствии боррелиозного антигена со-

держание ТРФ-β1 в супернатантах культур клеток крови, полученных у пациентов с хроническим течением ИКБ, достоверно превышало уровень его спонтанной продукции. Существуют данные о повышении индуцированной боррелиями экспрессии FoxP3 мРНК (специфического маркера Treg) CD4⁺-лимфоцитами у больных с хроническим ИКБ, в то время как экспрессия, индуцированная другими митогенами, остается одинаковой как у пациентов с ИКБ, так и у здоровых доноров [15, 16, 18]. С этим согласуются собственные результаты, полученные у пациентов с хроническим инфекционным процессом. Повышенная антигенстимулированная продукция ТРФ-β1 клетками крови пациентов с хроническим ИКБ, выявленная *in vitro*, косвенно свидетельствует об активации антиген-специфических клонов Treg, что, вероятно, способствует угнетению иммунного ответа на патоген и создает возможность для длительной персистенции боррелий. У пациентов с последующей хронизацией ИКБ цитокиновый ответ на боррелиозный антиген сохранялся на уровне спонтанной продукции ТРФ-β1 (см. таблицу), что позволяет предположить вовлечение в активацию антиген-специфических клонов Treg еще на стадии острого инфекционного процесса. Кроме того, можно предположить, что отсутствие изменения продукции ТРФ-β1 в ответ на ФГА у всех пациентов с ИКБ свидетельствует о низкой функциональной активности Treg в отношении неспецифических активаторов иммунного ответа, что создает угрозу формирования аутоиммунных расстройств.

Заключение

Таким образом, проведенное исследование выявило, что для пациентов с последующей хронизацией ИКБ характерен высокий уровень спонтанной продукции ИФН-γ в острый период заболевания, ассоциированный со снижением ФГА-стимулированной цитокинопродукции, что может указывать на формирование антиген-специфического иммунного ответа преимущественно по Th1-пути. Адаптивные возможности Th2-пути иммунного ответа у данных лиц сни-

жены, что подтверждается отсутствием стимулирующего влияния боррелиозного антигена на продукцию ИЛ-4. Подобные изменения, вероятно, обусловлены антагонистическими влияниями ключевых цитокинов Th1- и Th2-путей иммунного ответа. Выявленное усиление антигенстимулированной продукции ТРФ-β1 у пациентов с хроническим течением ИКБ косвенно свидетельствует о высокой активности антиген-специфических клонов Treg, что может быть одной из причин неэффективного противоборрелиозного ответа. Следствием указанных особенностей функционирования регуляторных субпопуляций лимфоцитов может выступать отсутствие эффективного противоборрелиозного ответа, поддержание длительной персистенции возбудителя и хронизация заболевания, а также повышение риска формирования аутоиммунных осложнений хронического ИКБ.

Литература

1. *Ананьева Л.П.* Иксодовые клещевые боррелиозы (лаймская болезнь). Экология, клиническая картина и этиология // *Терапевт. архив.* 2000. № 5. С. 72—78.
2. *Бабкин А.В.* Клинико-иммунологическая характеристика поздних кожных проявлений иксодового клещевого боррелиоза в северо-западном регионе России: автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб., 1998. 22 с.
3. *Быковская Н.С., Насонов Е.Л.* Роли дефектов иммуносупрессии в развитии аутоиммунных заболеваний // *Науч.-практ. ревматология.* 2005. № 4. С. 81—84.
4. *Васильева Ю.П.* Клинико-иммунологические критерии хронизации иксодового клещевого боррелиоза у детей: автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб., 2003. 16 с.
5. *Деконенко Е.П.* Клинико-эпидемиологические особенности Лайм-боррелиоза // *Врач.* 2004. № 2. С. 10—18.
6. *Козлов С.С.* Лайм-боррелиоз в Северо-Западном регионе России: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. СПб., 1999. 25 с.
7. *Лобзин Ю.В., Усков А.В., Козлов С.С.* Лайм-боррелиоз (иксодовые клещевые боррелиозы). СПб.: Фолиант, 2000. 160 с.
8. *Лукашова Л.В.* Микст-инфекция — иксодовый клещевой боррелиоз (аспекты патогенеза, клиники, лечения): автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Новосибирск, 2006. 46 с.
9. *Ревматические болезни: руководство по внутренним болезням* / под ред. Е.И. Чазова и др. М.: Медицина, 1997. 520 с.
10. *Симакова А.И., Мандракова Н.В., Маркелова Е.В., Иванис В.А.* Цитокиновый профиль у больных с иксодовым клещевым боррелиозом // *Цитокины и воспаление.* 2004. Т. 3, № 4. С. 21—23.
11. *Федоров Е.С., Барскова В.Г., Ананьева Л.П. и др.* Механизмы регуляции воспаления и иммунитета в патогенезе болезни Лайма // *Клинич. медицина.* 1999. № 6. С. 14—18.
12. *Bolz D.D., Weis J.J.* Molecular mimicry to *Borrelia burgdorferi*: pathway to autoimmunity? // *Autoimmunity.* 2004. V. 37, № 5. P. 387—392.
13. *Ghosh S., Seward R., Costello C.E. et al.* Autoantibodies from synovial lesions in chronic, antibiotic treatment-resistant Lyme arthritis bind cytokeratin-10 // *Immunol.* 2006. V. 177, № 4. P. 2486—2494.
14. *Guerrou-de-Arellano M., Huber B.T.* Development of autoimmunity in Lyme arthritis // *Curr. Opin. Rheumatol.* 2002. V. 14, № 4. P. 388—393.
15. *Jarefors S.* The role of T helper 1-like immunity and aspects of I co-exposure in relation to disease. Linköping, 2006. 91 p.
16. *Jarefors S., Janefjord C.K., Forsberg P. et al.* Decreased up-regulation of the interleukin-12Rβ2-chain and interferon-γ secretion and increased number of forkhead box P3-expressing cells in patients with a history of chronic Lyme borreliosis compared with asymptomatic *Borrelia*-exposed individuals // *Clinical & Experimental Immunology.* 2007. V. 147, № 1. P. 18—27.
17. *Kamradt T., Volkmer-Engert T.* Cross-reactivity of T lymphocytes in infection and autoimmunity // *Mol. Divers.* 2004. V. 8, № 3. P. 271—280.
18. *Nardelli D.T., Cloute J.P., Luk K.H. et al.* CD4⁺CD25⁺-T cells prevent arthritis associated with *Borrelia* vaccination and infection // *Clinical and diagnostic laboratory immunology.* 2005. V. 12, № 6. P. 786—792.
19. *Raveche E.S., Schutzer S.E., Fernandes H. et al.* Evidence of borrelia autoimmunity-induced component of Lyme carditis and arthritis // *J. of Clinical Microbiology.* 2005. V. 43, № 2. P. 850—856.
20. *Steere A.C., Gross D., Meyer A.L., Huber B.T.* Autoimmune mechanisms in antibiotic treatment-resistant Lyme arthritis // *J. Autoimmun.* 2001. V. 16, № 3. P. 263—268.

Поступила в редакцию 01.07.2009 г.

Утверждена к печати 22.12.2009 г.

Сведения об авторах

А.С. Барзулина — соискатель кафедры иммунологии и аллергологии СибГМУ (г. Томск).

Е.Н. Кологривова — д-р мед. наук, профессор кафедры иммунологии и аллергологии СибГМУ (г. Томск).

О.Б. Жукова — д-р мед. наук, доцент кафедры фундаментальных основ клинической медицины СибГМУ (г. Томск).

О.Е. Чечина — канд. мед. наук, докторант кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

Для корреспонденции

Бараулина А.С., Колозривова Е.Н., Жукова О.Б., Чечина О.Е. Особенности продукции цитокинов при хронизации ИКБ

Чечина Ольга Евгеньевна, тел. 8-905-089-2137, e-mail: olga_chechina@mail.ru