

## ПАТОФИЗИОЛОГИЯ

УДК 616.988.25-002.954.2:616.151.5

Н. П. Пирогова, В. В. Новицкий, Л. В. Бабаева, О. В. Воронкова, М. Р. Карпова,  
О. В. Михайлова, А. П. Мельникова, О. В. Буров, В. Г. Козлов

## ХАРАКТЕРИСТИКА НЕЙТРОФИЛЬНОГО И МОНОЦИТАРНОГО ПАТТЕРНОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ИКСОДОВОМ КЛЕЩЕВОМ БОРРЕЛИОЗЕ

Сибирский государственный медицинский университет МЗ РФ  
НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН, Томск

У больных иксодовым клещевым боррелиозом исследовались показатели метаболической и фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов. В начальной стадии и в период разгара клинической симптоматики заболевания обнаруживались нарушения метаболического и функционального статуса нейтрофилов, моноцитов; регистрировалось угнетение резервных возможностей мононуклеарных клеток продуцировать оксид азота. В динамике инфекционного процесса параметры фагоцитарной активности нейтрофильных лейкоцитов нормализовались быстрее, чем показатели макрофагального фагоцитоза.

**Ключевые слова:** иксодовый клещевой боррелиоз, нейтрофильные лейкоциты, моноциты

Иксодовый клещевой боррелиоз (болезнь Лайма) – инфекционное природно-очаговое заболевание с трансмиссивным путем передачи, вызываемое патогенными боррелиями и характеризующееся системным характером поражения, стадийным течением, склонным к рецидивированию и хронизации. Болезнь Лайма по показателям заболеваемости в Российской Федерации занимает одно из первых мест среди всех природно-очаговых зоонозов [6]. Инокулированные с укусом клеща возбудители Лаймского боррелиоза кооперируются с тканевыми макрофагами, обуславливая первичную воспалительную реакцию [5, 9]. В процессе фагоцитоза происходит киллинг возбудителей; фрагменты лизированных микроорганизмов становятся доступными иммунной системе, в результате чего инициируются механизмы адаптивного иммунитета [6, 13]. Однако в ряде случаев наблюдается незавершенный фагоцитоз, в связи с чем создаются условия для последующей персистенции возбудителей и хронизации заболевания [14].

Целью настоящего исследования явилось изучение показателей иммуннофагоцитарной системы у больных острыми формами иксодового клещевого боррелиоза.

**Методика.** В работе приводятся результаты обследования 45 лиц мужского и женского пола в возрасте от 18 до 55 лет, больных иксодовым клещевым боррелиозом (острая безэритемная форма, средняя и тяжелая степень заболевания). Процент были осмотрены на 1-е – 3-и (начальная стадия), 5–7-е (стадия разгара) и 25–30-е (стадия клинического выздоровления) сутки от начала заболевания. Диагноз устанавливался на основе дан-

ных анамнеза: факт присасывания клеща, клиническая картина заболевания, серологическое подтверждение наличия специфических противоборрелиозных антител (иммуноферментный анализ – ИФА). Контрольную группу составили 20 здоровых доноров с сопоставимыми характеристиками по полу и возрасту.

Материалом исследования явилась венозная кровь. Определение содержания гликогена, липидов, неферментного катионного белка выполняли по методам, описанным М.Г. Шубичем [12]. Ферментативную активность щелочной и кислой фосфатаз, неспецифической эстеразы определяли по методам, представленным Ф.Г. Хейхоу [10]. По результатам подсчета клеток рассчитывали средний цитохимический коэффициент (СЦК).

Фагоцитарную активность нейтрофильных гранулоцитов, моноцитов и экспрессию рецепторов Fcγ- и C3β-моноцитами изучали стандартными методами, описанными нами ранее [8].

Продукцию оксида азота (NO•) определяли в супернатантах. Выделенные в градиенте плотности фикола-урографина (1077) мононуклеарные клетки культивировали в среде RPMI-1640 (“Sigma”) с добавлением 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки; 0,3 мг/мл L-глутамина, 5 мМ Нерес, 100 мкг/мл гентамицина при 37° и 5% CO<sub>2</sub> в течение 24 часов. Стимулировали продукцию NO• добавлением в среду липополисахаридов (ЛПС) (LPS from *E.coli* 026:B6 “Sigma”) [2,15]. Супернатант (100 мкл) помещали в 96-луночный планшет в равных количествах с раствором сульфаниламида и N-(1-нафтил)-этиленамида в 2,5% ортофосфорной кислоте (ICN). Опти-

ческую плотность раствора регистрировали на аппарате MULTISCAN при длине волны 550 нм. Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием U-критерия.

**Результаты.** При иксодовом клещевом боррелиозе изменения содержания лейкоцитов в периферической крови касались отдельных морфологических форм. Нарушения лейкоцитарной формулы характеризовались увеличением количества незрелых форм гранулоцитов и снижением числа сегментоядерных нейтрофильных лейкоцитов, преходящей моноцитопенией и лимфоцитозом (табл.1).

Известно, что целые клетки *borrelii burgdorferi*, а также липопроtein их наружной поверхности, попадая в кожу макроорганизма взаимодействуют с тканеспецифическими макрофагами [4], обуславливая повышение их функциональной активности, вследствие чего усиливаются синтез и секреция цитокинов [3, 14]. Воспалительные цитокины

(ИЛ-1,6,8, ФНО, интерферонов) индуцируют экспрессию эндотелиальными клетками адгезивных белков типа ICAM-1 и VCAM-1, сопровождающуюся экстравазацией лейкоцитов [3].

Механизм нейтропении и моноцитопении, возможно, обусловлен усиленной их миграцией из периферической крови в очаг воспаления, что характерно для стадии разгара болезни, которая в ряде случаев проявляется воспалительной реакцией кожи [14].

На 1-ой стадии заболевания содержание гликогена, липидов, щелочной фосфатазы, неферментных катионных белков в нейтрофильных гранулоцитах было снижено, при этом их поглотительная способность также уменьшалась (табл. 2, 3). В то же время показатель завершенности фагоцитоза в начальной стадии иксодового клещевого боррелиоза оказался на 17% выше уровня аналогичного параметра у здоровых доноров (табл. 3).

Таблица 1

**Общее количество лейкоцитов и гемограмма больных иксодовым клещевым боррелиозом,  $M \pm m$**

Исследуемый показатель		Больные иксодовым клещевым боррелиозом			Здоровые доноры
		Начало болезни	Разгар заболевания	Клиническое выздоровление	
Общее количество лейкоцитов, $10^9/\text{л}$		6,42±0,27	5,45±0,19	5,86±0,22	5,34±0,19
Гемограмма, %	Метамиелоциты	–	2,0±0,10*,**	1,0±0,04*,**	–
	Палочкоядерные нф	6,81±0,22*	7,32±0,27*	6,14±0,24*	3,40±0,13
	Сегментоядерные нф	39,72±1,96	22,0±0,79*,**	22,57±0,77*,**	39,0±1,52
	Эозинофилы	1,92±0,06	3,0±0,15	3,0±0,15	1,80±0,07
	Базофилы	–	–	0,43±0,01	0,60±0,03
	Моноциты	6,24±0,32	4,30±0,22*	7,57±0,26***	7,20±0,37
	Лимфоциты	45,11±1,72	61,0±2,99*,**	58,57±2,11*,**	48,60±2,4

Примечание. \* –  $p < 0,05$ , достоверность различия показателей по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров; \*\* –  $p < 0,05$ , достоверность различий показателей у больных по сравнению с начальным периодом заболевания; \*\*\* –  $p < 0,05$ , достоверность различия показателей у больных в стадии клинического выздоровления по сравнению с аналогичными в разгаре заболевания (нф – нейтрофилы).

Таблица 2

**Цитохимический статус фагоцитов периферической крови у больных иксодовым клещевым боррелиозом,  $M \pm m$**

Субстраты и ферменты, СЦК	Фагоциты	Больные иксодовым клещевым боррелиозом			Здоровые доноры
		Начало заболевания	Разгар болезни	Клиническое выздоровление	
Гликоген	Нейтрофилы	1,597±0,067*	1,705±0,064*	2,446±0,204**,***	2,343±0,114
	Моноциты	0,600±0,231	0,690±0,83	0,490±0,043	0,622±0,116
Липиды	Нейтрофилы	1,187±0,263*	2,901±0,043**	2,236±0,094	2,880±0,035
	Моноциты	1,000±0,185	0,789±0,254	0,990±0,383	0,926±0,377
Неспецифическая эстераза	Моноциты	1,065±0,005*	1,292±0,059	1,265±0,119	1,238±0,062
Щелочная фосфатаза	Нейтрофилы	0,130±0,700*	0,463±0,131*	0,510±0,147*	1,010±0,240
Кислая фосфатаза	Нейтрофилы	0,980±0,010	0,932±0,047	0,803±0,148	0,828±0,179
Неферментные катионные белки	Нейтрофилы	1,320±0,127*	1,619±0,128*	1,797±0,137	2,098±0,161

Примечание. \* –  $p < 0,05$ , достоверность различия показателей по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров; \*\* –  $p < 0,05$ , достоверность различия показателей у больных по сравнению с начальным периодом заболевания; \*\*\* –  $p < 0,05$ , достоверность различия показателей у больных в стадии клинического выздоровления по сравнению с аналогичными в разгаре заболевания.

Таблица 3

**Уровень макрофагального и нейтрофильного фагоцитоза, экспрессии Fcγ- и C3β-рецепторов на моноцитах периферической крови, выделения оксида азота ( $\text{мкМ/мл} \times 2,5 \times 10^6/\text{л}$ ) у больных иксодовым клещевым боррелиозом,  $M \pm m$**

Исследуемый показатель	Больные иксодовым клещевым боррелиозом			Здоровые доноры
	Начало заболевания	Разгар болезни	Клиническое выздоровление	
Фагоцитоз макрофагальный, ед. опт. пл.	60,21±2,08*	113,00±9,51**	102,81±7,51**	100,05±4,83
Fcγ <sup>+</sup> -моноциты, %	22,43±0,63	21,62±2,83*	20,33±3,22*	26,06±1,12
C3β <sup>+</sup> -моноциты, %	26,62±1,91	17,21±2,91*,**	24,70±3,41***	24,82±2,64
Базальная продукция NO моноцитами	Нет данных	3,89±0,36*	Нет данных	7,44±0,76
Стимулированная продукция NO моноцитами	Нет данных	1,39±0,15*	Нет данных	13,68±1,35
Показатель активности нейтрофилов, %	57,14±3,54	54,00±9,05	52,80±8,31	65,30±1,28
Поглотительная способность нейтрофилов, ЕД	2,88±0,092*	4,9±1,06**	4,1±1,17	4,11±0,45
Показатель завершенности фагоцитоза, %	74,85±5,46*	62,90±1,47**	69,40±1,26	64,09±2,15

Примечание. \* –  $p < 0,05$ , достоверность различия показателей по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров; \*\* –  $p < 0,05$ , достоверность различия показателей у больных по сравнению с начальным периодом заболевания; \*\*\* –  $p < 0,05$ , достоверность различия показателей у больных в стадии клинического выздоровления по сравнению с аналогичными в разгаре заболевания.

Обнаруженные нами факты могут служить косвенным свидетельством преобладания в нейтрофилах периферической крови больных в начале заболевания катаболических процессов, необходимых для активации, осуществления миграции, фагоцитирования и окончательного метаболизма поглощенного объекта, феноменологические проявления чего были зарегистрированы на данной стадии инфекционного процесса [7]. Метаболический статус моноцитов периферической крови на 1-ой стадии Лаймского боррелиоза характеризовался снижением СЦК неспецифической эстеразы, что сопровождалось достоверным изменением их фагоцитарной активности (табл. 2, 3).

В стадии разгара клинических проявлений иксодового клещевого боррелиоза отмечалась положительная динамика изменений содержания гликогена, липидов, щелочной фосфатазы, неферментных катионных белков в нейтрофильных лейкоцитах, однако их СЦК не достигал контрольных значений (табл. 2). Показатели функциональной активности гранулоцитов на данной стадии заболевания нормализовались (табл.3). В моноцитарном звене неспецифической резистентности, напротив, обнаруживалось уменьшение числа Fcγ<sup>+</sup>- и C3b<sup>+</sup>-моноцитов на фоне восстановления показателя макрофагального фагоцитоза. Fcγ-рецепторы на фагоцитирующих клетках играют роль в осуществлении пиноцитоза иммунных комплексов, фагоцитоза сенсibilизированных антигенами частиц и антителозависимой клеточной цитотоксичности. Согласно данным литературы, для полноценной деятельности Fcγ-рецепторов необходима определенная конфигурация фосфолипидного слоя плазматической мембраны [11].

Не исключено, что конформационные изменения цитоплазматической мембраны в результате

модификации липидов под влиянием активных форм кислорода (перекисное окисление липидов), действия экзотоксинов боррелий индуцируют угнетение экспрессии поверхностных рецепторов моноцитов. Снижение уровня экспрессии C3b-рецепторов на моноцитах крови больных может быть обусловлено, наряду с деструкцией мембран, потерей гидролитических ферментов. Гидролазы лизосом активируют C3-конвертазу, под влиянием которой образуются фрагменты C3b и C3a [3]. При дефиците гидролитических ферментов снижается образование C3b-фрагмента, которое приводит к уменьшению экспрессии C3b-рецепторов.

Выделение NO моноцитами во 2-ой стадии Лаймского боррелиоза оказалось значительно сниженным по сравнению с аналогичным показателем у здоровых доноров (табл. 3). Известно, что физиологические концентрации радикала, индуцируемые конститутивной NO-синтазой, оказываются недостаточными для реализации противомикробной защиты клеток. Токсические для инфекционных агентов дозы NO вырабатываются только активированными макрофагами [1]. Стимуляция культивируемых мононуклеаров здоровых доноров инициировала достоверное увеличение продукции NO<sup>•</sup> практически в два раза. Напротив, стимулированная продукция NO у больных иксодовым клещевым боррелиозом оказалась достоверно ниже, чем базальная.

В стадии клинического выздоровления сохранялись сниженными СЦК щелочной фосфатазы нейтрофилов и количество Fcγ-несущих моноцитов периферической крови пациентов.

**Заключение.** Таким образом, при сравнительной характеристике фагоцитарной активности и метаболического статуса нейтрофилов и моноцитов в динамике развития острого иксодового кле-

щего боррелиоза наблюдалось менее выраженное и наиболее быстрое восстановление фагоцитарных способностей нейтрофильных лейкоцитов. Метаболический профиль моноцитарных клеток периферической крови у больных людей полностью нормализовался на фоне сохранения низкой экспрессии Fcγ-рецепторов.

#### CHARACTERISTIC OF NEUTROPHILIC AND MONOCYTIC PATTERNS IN PERIPHERAL BLOOD DURING IXODIC TICK-BORNE BORRELIOSIS

N.P. Pirogova, V.V. Novitskiy, L.V. Babaeva,  
O.V. Voronkova, M.R. Karpova, O.V. Mihailova,  
A.P. Melnikova, O.V. Burov, V.G. Kozlov

Rates of metabolic and phagocytic activity were investigated in patients with Ixodic tick-borne borreliosis. In the initial stage and at the height of the clinical finding were revealed disorders of metabolic and functional state of neutrophils and monocytes; also was registered suppression of spare capacities of mononuclear cells to produce nitrogen oxide. In dynamics of infectious process phagocytic activity's parameters of neutrophilic leucocyte were normalized faster than rates of macrophage phagocytosis.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бондаренко В.М., Виноградов Н.А., Малеев В.В. // Журн. микробиологии. 1999. № 5. С. 61–67.

2. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шахов В.П. Методы культуры тканей в гематологии. Томск, 1992.
3. Козлов И.Г., Горлина Н.К., Чередеев А.Н. // Иммунология. 1995. № 4. С. 16–25.
4. Козлов С.С. // Вестник инфектологии. 1999. № 5. С. 65–83.
5. Коренберг Э.И., Щербаков С.В., Захарычева Т.А. // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 1989. № 5. С. 74–78.
6. Лобзин Ю.В. Болезнь Лайма – клещевой боррелиоз. СПб., 1996.
7. Маянский А.Н., Маянский Д.Н. Очерки о нейтрофилах и макрофагах. Новосибирск, 2000.
8. Пирогова Н.П., Сюсина Л.В., Воронкова О.В. // БЭБиМ. Прилож. 1. 2002. С. 52–55.
9. Саидов М.З., Гомес Л.А., Ярцев М.Н. // Журн. микробиологии. 1996. № 5. С. 47–53.
10. Хейхоу Ф.Г., Кваглино Д. Гематологическая цитохимия. М., 1983.
11. Чередеев А.И. // Иммунология. 1995. № 3. С. 21–26.
12. Шубич М.Г. // Цитология. 1974. № 10. С. 1321–1322.
13. Donald C. Abele, Kenia H. Anders. // J. Am. Acad Dermatol. 1990. Vol. 2. P. 167–186.
14. Ganapamo F., Dennis V.A., Philipp M.T. // Infect. Immun. 2000. Vol. 68. P. 7162–7165.
15. Green L.C., Wagner D.A., Glogowsky S. et al. // Anal. Biochem. 1982. Vol. 126. P. 131–136.