

На правах рукописи

**Семенов
Альберт Геннадьевич**

**ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ,
НАРУШЕНИЕ БАЛАНСА ПРОЛИФЕРАЦИИ И
АПОПТОЗА ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ
ИКСОДОВЫМ КЛЕЩЕВЫМ БОРРЕЛИОЗОМ**

3.3.3. Патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Иркутск – 2023

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, доцент

Воронкова Ольга Владимировна

Официальные оппоненты:

Дубровина Валентина Ивановна – доктор биологических наук, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, лаборатория патофизиологии, заведующая лабораторией

Литвинова Лариса Сергеевна – доктор медицинских наук, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», Центр иммунологии и клеточных биотехнологий, директор; кафедра фундаментальной медицины образовательного научного кластера «Институт медицины и наук о жизни (ОНК МЕДБИО)», профессор

Ведущая организация – Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (г. Красноярск)

Защита диссертации состоится «__» _____ 2023 года в ____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.187.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» по адресу: 664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, д. 16.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» и на сайте: <http://health-family.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук

Гребенкина
Людмила Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень её разработанности

Иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ) является одной из самых распространенных трансмиссивных природно-очаговых инфекций в Российской Федерации и ежегодно занимает лидирующую позицию по частоте регистрации среди инфекций, передаваемых клещами [Государственный доклад Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2022 году», 2023]. Видовая гетерогенность боррелий, широкий спектр клинических проявлений, склонность к затяжному хроническому течению, а также трудности ранней лабораторной диагностики, особенно при безэритемных формах заболевания, определяют актуальность исследований, направленных на изучение иммунопатогенеза ИКБ.

Как известно, ведущую роль в процессах межклеточной кооперации при реализации антибактериального иммунного ответа играют клетки системы мононуклеарных фагоцитов. Активация макрофагов в процессе взаимодействия с микробными антигенами сопровождается усилением реакций респираторного взрыва и наработкой иммунорегуляторных цитокинов, координирующих дифференцировку, пролиферативный ответ и эффекторные функции Т- и В-лимфоцитов. Одной из форм ответа лимфоцитов на активационные стимулы, наряду с пролиферацией, является апоптоз. Баланс реакций пролиферации и апоптоза служит важнейшим критерием состоятельности иммунного ответа лимфоцитов на антигены и определяет результативность инфекционно-зависимого воспаления [Китаева К. Р., 2019]. Апоптоз иммуноцитов при инфекционном процессе, прежде всего, необходим для разрешения острого воспаления путём устранения поврежденных или гиперстимулированных клеток [Vocchino M. et al., 2005; Anstee N. C. et al., 2017]. Такой механизм активационно-индуцированной клеточной смерти (АИКС) используется для поддержания оптимального пула активных иммунных клеток, а также для контроля аутоиммунных реакций, которые могут развиваться в ответ на первичную и вторичную альтерацию тканей организма [Anstee N. C. et al., 2017].

Многие инфекционные агенты способны напрямую или опосредованно влиять на активность апоптоза иммунокомпетентных клеток, при этом стратегия управления процессами программированной клеточной гибели со стороны патогена определяется его биологическими свойствами (тропизм) и местом преимущественной локализации (вне или внутри клетки). Например, индуцированное лимфотропными вирусами подавление реакций апоптоза и АИКС лимфоцитов рассматривается специалистами как один из механизмов защитной стратегии, приводящих к повышению выживаемости патогенов внутри клеток и к нарушению их элиминации из организма [Жукова О. Б., 2006; Дернова А. С., Косолапова М. А., 2022]. С другой стороны, индукция апоптоза эффекторных популяций лейкоцитов может использоваться патогенными микроорганизмами для ослабления реакций адаптивного иммунитета. При ряде бактериальных инфекций накопление нерепарированных повреждений в

ДНК вследствие мутагенного действия патоген-ассоциированных молекул, бактериальных эндо- и экзотоксинов, реактивных метаболитов кислорода и азота, способствует активации протеинкиназ и запуску внутреннего пути апоптоза в иммунокомпетентных клетках [Дружинин Г. В. и соавт., 2018].

К настоящему времени накоплено большое количество экспериментальных и клинических данных, характеризующих клинико-иммунологические особенности ИКБ. Дефекты макрофагально-фагоцитарного звена иммунной системы, нарушения цитотоксических механизмов иммунной защиты в сочетании с дисбалансом субпопуляционного состава лимфоцитов были зарегистрированы как при остром, так и при хроническом течении боррелиоза [Запорожец Т. С. и соавт., 2019; Миноранская Н. С. и соавт., 2020; Сапожникова В. В., 2020]. При этом механизмы цитопатического воздействия патогенных боррелий на иммунocyты, характер деструктивных кариопатологических изменений, дисбаланс процессов пролиферации и апоптоза, характеризующий нарушение функционального гомеостаза клеток, при различных клинических вариантах ИКБ исследованы недостаточно.

Цель исследования – установить закономерности кариопатологических изменений и нарушений цитогенетического статуса, апоптотической и пролиферативной активностей лимфоцитов крови у больных иксодовым клещевым боррелиозом для разработки подходов к профилактике его хронизации.

Задачи исследования:

1. Установить общие закономерности и особенности кариопатологических изменений и цитогенетических нарушений в лимфоцитах периферической крови у больных с манифестной формой ИКБ при остром и хроническом течении.
2. Оценить апоптотическую и пролиферативную активности лимфоцитов периферической крови у пациентов с острым и хроническим ИКБ при культивировании клеток *in vitro* на базальном уровне, при неспецифической (фитогемагглютинин) и специфической (антиген *Borrelia garinii*) стимуляции.
3. Определить влияние *B. garinii* на цитогенетический статус и активность апоптоза лимфоцитов в культуре *in vitro*.
4. Провести анализ изменений цитогенетического статуса, пролиферативной и апоптотической активностей лимфоцитов крови во взаимосвязи с уровнем продукции иммунорегуляторных цитокинов мононуклеарными лейкоцитами в культуре *in vitro* (IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α) у больных с острым и хроническим ИКБ.

Научная новизна исследования

Впервые дана подробная характеристика различных типов митотической патологии и хромосомных нарушений в лимфоцитах крови у больных острым и хроническим ИКБ, свидетельствующих о цитогенетической нестабильности иммунокомпетентных клеток на фоне инфекции. Установлено, что при ИКБ, независимо от варианта течения инфекции, в периферической крови повышается число лимфоцитов с числовыми и структурными хромосомными абберациями (преимущественно хроматидного типа) и клеток с патологией ядра вследствие нарушения нормального хода митоза. У пациентов в острый период боррелиозной инфекции впервые был выявлен абберантный кариотип с увеличением

прицентромерного района 9 пары гомологичных хромосом. Впервые описан дозозависимый эффект *B. garinii* в культуре лимфоцитов периферической крови здоровых лиц, выражающийся в индукции апоптоза и формировании спектра цитогенетических нарушений, аналогичных изменениям в лимфоцитах крови у больных с острым ИКБ. Впервые было установлено, что независимо от варианта течения манифестной формы боррелиозной инфекции, регистрируется высокая антиген-индуцированная пролиферативная активность лимфоцитов крови в культуре *in vitro*. Активная пролиферация лимфоцитов в острый период заболевания сочетается с усилением их апоптоза, тогда как при хроническом течении апоптотическая активность лимфоцитов снижена, что может рассматриваться как один из патогенетических факторов хронизации боррелиозной инфекции. Впервые установлено, что нарушения цитогенетического статуса, апоптотической и пролиферативной активностей лимфоцитов у больных острым и хроническим ИКБ формируются на фоне усиления спонтанной и антиген-индуцированной выработки клетками провоспалительных цитокинов IFN- γ , TNF- α , IL-6.

Теоретическая и практическая значимость работы

В результате проведенных исследований получены новые данные, расширяющие существующие на сегодняшний день представления о цитопатическом влиянии патогенных боррелий на иммунокомпетентные клетки. Полученные данные о кариопатологических изменениях, цитогенетических нарушениях, дисбалансе процессов пролиферации и апоптоза характеризуют нарушение гомеостаза лимфоцитов при ИКБ и могут представлять теоретический и практический интерес для клинической медицины и разработки путей коррекции структурно-функционального статуса иммунокомпетентных клеток для предотвращения хронизации боррелиозной инфекции. Приоритетными можно считать данные о влиянии одного из видов патогенных боррелий *B. garinii* на лимфоциты человека в культуре *in vitro*, выражающемся в дозозависимой индукции апоптоза, хромосомных aberrаций и нарушении нормального хода митоза. В связи с этим, перспективным представляется дальнейшее изучение особенностей иммунопатогенеза ИКБ в зависимости от видовой принадлежности и генотипических особенностей инфицирующего штамма боррелий для разработки способов дифференциальной диагностики, а также прогнозирования неблагоприятного течения и исходов заболевания.

Методология и методы исследования

Для решения поставленных задач было проведено обследование 43 пациентов с манифестной формой ИКБ, из которых 22 больных с острым течением ИКБ (были обследованы в острый период и через 3 месяца после перенесённого заболевания) и 21 пациент с хроническим рецидивирующим течением ИКБ с преимущественным поражением опорно-двигательного аппарата в стадии субкомпенсации. Контрольную группу составили 23 здоровых добровольца с сопоставимыми характеристиками по полу и возрасту. Все исследования были проведены на первичной культуре мононуклеарных лейкоцитов, полученных методом градиентного центрифугирования из венозной крови. Для оценки цитогенетического статуса,

кариопатологических изменений, апоптотической и пролиферативной активностей лимфоцитов осуществляли культивирование лейкоцитов в разных условиях – без и с добавлением индукторов (фитогемагглютинаина и корпускулярного боррелиозного антигена). Наряду с основными сериями культуральных клеточных суспензий, полученных из крови пациентов и здоровых лиц, из образцов крови здоровых доноров были подготовлены дополнительные серии клеточных суспензий для экспериментального изучения влияния разных концентраций живых боррелий вида *B. garinii* на цитогенетический статус и активность апоптоза лимфоцитов крови в условиях *in vitro*. При выполнении исследования использованы методы рутинной и дифференциальной окраски хромосом (техники G- и C-бэндов), иммуноферментный анализ для определения концентрации цитокинов в культуральной среде, стандартный морфологический метод оценки реакции бластной трансформации лимфоцитов в комплексе с методами лазерной проточной цитометрии для количественного определения лимфоцитов, находящихся на разных этапах клеточного цикла, а также клеток в состоянии апоптоза.

Положения, выносимые на защиту:

1. При манифестной форме ИКБ в лимфоцитах периферической крови выявляются кариопатологические изменения и нарушения цитогенетического статуса, характер которых не зависит от варианта течения инфекции (острое или хроническое) и включает широкий спектр атипичных форм митоза, структурных и числовых хромосомных aberrаций.
2. Повышение спонтанной и антиген-индуцированной пролиферативной активности лимфоцитов крови в культуре *in vitro* характерно как для острой, так и для хронической формы ИКБ. При этом активная пролиферация лимфоцитов в острый период заболевания сочетается с усилением их апоптоза, тогда как при хроническом течении боррелиозной инфекции апоптотическая активность лимфоцитов снижена.
3. Эффекты *B. garinii* на лимфоциты крови здоровых лиц в условиях *in vitro* выражаются в индукции апоптоза лимфоцитов и формировании спектра кариопатологических изменений и цитогенетических нарушений, аналогичных таковым в лимфоцитах крови больных с острым течением ИКБ.
4. Изменения цитогенетического статуса, пролиферативной и апоптотической активностей лимфоцитов, как при остром, так и при хроническом течении ИКБ происходят на фоне усиления спонтанной и антиген-индуцированной выработки мононуклеарными лейкоцитами провоспалительных цитокинов IFN- γ , TNF- α , IL-6 в культуре *in vitro*.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обусловлена достаточным объемом клинического материала, однородностью выборки субъектов, применением современных и информативных методов исследования, а также адекватных методов биомедицинской статистики и всесторонним теоретическим обоснованием полученных данных.

Основные положения диссертации были доложены и обсуждены на VII Международной научно-практической конференции «Современные аспекты патогенеза, клиники, диагностики, лечения и профилактики протозоозов, гельминтозов и арахноэнтомозов человека, животных и растений» (Витебск, 2010); на Юбилейной научно-практической конференции, посвященной 115-летию первой в России кафедры инфекционных болезней военно-медицинской академии имени С.М. Кирова (Санкт-Петербург, 2011); Межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы бактериологии» (Томск, 2011); XII Российском конгрессе молодых ученых с международным участием «Науки о человеке» (Томск, 2011); Научной конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные вопросы инфекционной патологии – 2011» (Санкт-Петербург, 2011); VIII Международной конференции «Молекулярная генетика соматических клеток» (Звенигород, 2011); IV Международной научной конференции «SCIENCE4HEALTH 2012: Клинические и теоретические аспекты современной медицины» (Москва, 2012); V Международной научной конференции «SCIENCE4HEALTH 2013: Клинические и теоретические аспекты современной медицины» (Москва, 2013); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Новые и возвращающиеся инфекции» (Уфа, 2016); I Международном научном медицинском конгрессе «Человек, его будущее в свете достижений современного естествознания» (Кемерово, 2021); Международной научно-практической конференции «Современные аспекты инфекционных болезней и микробиологии» (Гомель, 2022).

Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедры биологии и генетики ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России для студентов, обучающихся по дисциплинам «Медицинская биология» (специальности 31.05.01 Лечебное дело и 31.05.02 Педиатрия, тема «Мутагенез») и «Общая генетика» (специальности 30.05.01 Медицинская биохимия и 30.05.02 Медицинская биофизика, темы «Патология митоза», «Индукцированный мутагенез»), в учебный процесс кафедры микробиологии и вирусологии для студентов, осваивающих дисциплину «Микробиология, вирусология» (специальности 31.05.01 Лечебное дело и 31.05.02 Педиатрия, тема «Патогенные спирохеты»), в учебный процесс кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии для студентов, осваивающих дисциплину «Инфекционные болезни» (специальности 31.05.01 Лечебное дело и 31.05.02 Педиатрия, тема «Трансмиссивные инфекции (клещевые инфекции)»), в учебный процесс кафедры патофизиологии для студентов, осваивающих дисциплину «Патофизиология, клиническая патофизиология» (специальности 31.05.01 Лечебное дело и 31.05.02 Педиатрия, раздел «Типовые патологические процессы», темы «Патофизиология клетки», «Воспаление», «Роль иммунной системы в патологии»).

Личный вклад автора

Автору принадлежит основная роль в определении цели работы и постановке задач, разработке дизайна исследования. Автор самостоятельно осуществлял пробоподготовку исследуемого материала, проводил лабораторные исследования, обобщал и интерпретировал полученные результаты, принимал активное участие в обсуждении результатов исследования, написании статей и тезисов докладов. Все

основные результаты исследования получены лично автором и неоднократно докладывались им на конференциях различного уровня.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 32 научные работы, из них 3 статьи в ведущих рецензируемых журналах и изданиях, определенных ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ для опубликования основных научных результатов по научной специальности 3.3.3. Патологическая физиология (биологические науки), 6 статей в ведущих рецензируемых журналах, индексируемых базами данных RSCI, Scopus, РИНЦ, 23 публикации в сборниках научных трудов и материалах конференций и конгрессов.

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 120 страницах, состоит из введения, 4 глав, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 224 источника, из которых 67 отечественных и 157 зарубежных. Работа иллюстрирована 14 таблицами и 12 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Характеристика материала и методы исследования

В исследовании приняли участие 43 пациента с манифестной формой ИКБ, проходившие стационарное лечение в инфекционной клинике ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России. В зависимости от варианта течения заболевания пациенты были разделены на 2 группы. Первую группу составили 22 больных с острым течением ИКБ, мужского и женского пола в возрасте от 19 до 59 лет (средний возраст $43,14 \pm 2,71$ лет), из числа которых 12 пациентов (6 мужчин, 6 женщин) с эритемной серопозитивной формой ИКБ, 10 больных (4 мужчины, 6 женщин) с эритемной серонегативной формой заболевания. Вторую группу составили пациенты с хроническим рецидивирующим течением ИКБ с преимущественным поражением опорно-двигательного аппарата в стадии субкомпенсации. Пациенты данной группы (всего 21 больной (10 мужчин, 11 женщин) в возрасте от 26 до 60 лет (средний возраст $47,24 \pm 2,53$ лет)) находились на диспансерном наблюдении и проходили лечение в ОГАУЗ «Медико-санитарная часть «Строитель»» (г. Томск).

Обследование пациентов включало общеклинические лабораторные исследования, метод твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с определением концентрации IgM и IgG к *Borrelia burgdorferi s.l.* и к вирусу клещевого энцефалита (КЭ), а также антигена вируса КЭ с целью дифференциальной диагностики и исключения микст-вариантов боррелиозной и вирусной инфекции. Материалом для исследования являлась периферическая кровь. Кровь у пациентов с острым ИКБ брали при поступлении в стационар до назначения антибиотиков. Дополнительно через 3 месяца после перенесенного заболевания и эффективного курса антибиотикотерапии были обследованы 20 пациентов из первой группы. Таким образом, была сформирована еще одна группа (реконвалесценты), в которую вошли 9 мужчин и 11 женщин, средний возраст пациентов составил $43,55 \pm 2,85$ лет. Факт

выздоровления и отсутствие хронизации инфекции были подтверждены отсутствием клинической симптоматики и отрицательными результатами серологического обследования.

Контрольную группу составили 23 здоровых добровольца в возрасте от 24 до 56 лет (11 мужчин и 12 женщин, средний возраст $41,34 \pm 2,38$ лет), ранее не подвергавшихся присасыванию клещей, с отсутствием в анамнезе ранее перенесенных клещевых инфекций, не имевших в крови специфических антител к антигенам боррелий и вирусу КЭ, а также антигена вируса КЭ (Таблица 1). Лица контрольной группы не имели хронических инфекционных заболеваний, на момент обследования были клинически здоровы, жалоб не предъявляли, последний эпизод острого респираторного заболевания регистрировался не позднее, чем за 6 недель до проведения исследования. В состав всех групп были включены лица и мужского и женского пола ввиду отсутствия внутригрупповых статистически значимых различий анализируемых параметров в зависимости от половой принадлежности обследованных. Все пациенты и здоровые лица подписали информированное согласие на участие в исследовании. Проведение исследования было одобрено Этическим комитетом ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (протокол № 68 от 30.03.2009 г.).

Таблица 1 – Распределение групп обследованных лиц в зависимости от методов исследования

Методы исследования		Количество обследованных лиц			
		Больные с ОИКБ	Реконвалесценты	Больные с ХИКБ	Здоровые лица
Оценка цитокинпродуцирующей активности мононуклеарных лейкоцитов при культивировании <i>in vitro</i>		22	20	21	23
Анализ пролиферативной активности лимфоцитов (РБТЛ)	При добавлении БАГ	22	12	11	14
	При добавлении ФГА	22	20	21	23
Анализ кариопатологических изменений в лимфоцитах (выявление патологических форм митоза)		12	10	12	13
Хромосомный анализ лимфоцитов		12	10	12	13
Определение количества клеток в разных фазах клеточного цикла и в состоянии апоптоза методом проточной цитометрии	При добавлении БАГ	8	8	9	9
	При добавлении ФГА	7	7	7	7
Определение количества клеток в состоянии апоптоза по уровню фрагментации ДНК		9	-	7	7

Все исследования были проведены на первичных культурах мононуклеарных лейкоцитов, выделенных из гепаринизированной венозной крови методом градиентного центрифугирования (Ficoll-Paque, плотность 1,077 г/см³). Клетки культивировали в полной питательной среде на основе RPMI-1640 с L-глутамином («ПанЭко», Россия) с добавлением антибиотиков (100 мкг/мл стрептомицина и 100 МЕ/мл пенициллина), 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки при 37°C в присутствии 5% CO₂. Конечная концентрация мононуклеарных лейкоцитов в культуральных флаконах составила 2×10⁶ клеток/мл. В качестве индукторов пролиферативной, цитокинсекреторной и апоптотической активности клеток в культуре *in vitro* использовали классический митоген ФГА («ПанЭко», Россия) и инактивированный корпускулярный антиген *B. garinii*, который был получен из коллекции штаммов боррелий отдела разработки и экспериментального производства препаратов НПО «Вирион» филиала ФГУП «НПО Микроген» Минздрава России (г. Томск). Корпускулярный боррелиозный антиген (БАГ) вносили в пробы в конечной концентрации 2×10⁷ спирохет/мл, ФГА – в концентрации 10 мкг/мл.

Цитокинпродуцирующую способность мононуклеарных лейкоцитов оценивали в 24-часовых клеточных культурах. В супернатантах определяли концентрацию (пг/мл) IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF-α методом твердофазного ИФА (наборы ООО «Протеиновый контур» (Россия) и «Invitrogen Co» (США)).

Спонтанную и стимулированную пролиферативную активность лимфоцитов крови исследовали в реакции бластной трансформации в модифицированной клеточной культуре. Флаконы инкубировали при 37°C в присутствии 5% CO₂ в течение 72 часов (для интактной пробы и пробы с добавлением ФГА) или в течение 120 часов (для пробы с добавлением БАГ). Интенсивность РБТЛ определяли стандартным морфологическим методом в процессе световой микроскопии, анализируя не менее 500 клеток в каждом препарате и определяя долю (%) бласттрансформированных лимфоцитов.

Для анализа кариопатологических изменений в лимфоцитах на препаратах клеток из ФГА-модифицированных культур в процессе световой микроскопии определяли частоту встречаемости (%) различных типов митозов (нормальных и патологических) на 500 клеток согласно классификации И. А. Алова (1972), а также анализировали спектр кариопатологических изменений (появление бинуклеаров, клеток с микроядрами, клеток с деформацией ядер) [Ильинских Н. Н., 2005].

Для цитогенетического анализа мононуклеарные лейкоциты культивировали в стерильных флаконах в полной питательной среде с добавлением ФГА в течение 52 часов. За 2 часа до фиксации клеток в культуры добавляли колхицин («Sigma», США) в конечной концентрации 0,5 мкг/мл. После гипотонической обработки фиксировали клетки в трёх сменах охлаждённого фиксатора (3 части этанола и 1 часть ледяной уксусной кислоты); суспензии раскапывали на охлаждённые предметные стёкла и высушивали. Препараты окрашивали азур II-эозином по методу Романовского-Гимзы (рутинная окраска хромосом). Для каждой пробы анализировали не менее 100 метафаз. Изучение хромосом проводили с помощью микроскопа «Prima Star iLED»

(«Carl Zeiss», Германия), оснащённого цифровой камерой «AxioCam» («Carl Zeiss», Германия) при увеличении 10×100. Метафазные пластинки с цитогенетическими нарушениями фотографировали, изображения анализировали с помощью программы «AxioVision» модуль «Karyo» для кариотипирования.

Для дифференциального окрашивания хромосом использовали технику G-бэндов [Seabright M. A, 1971]. Препараты после фиксации помещали в 0,025% раствор трипсина при комнатной температуре на 10-15 сек, проводили через серию разведений этилового спирта (70%, 96%, 100%), высушивали и окрашивали раствором азур II-эозина. Для выявления конститутивных гетерохроматиновых блоков в центромерных регионах хромосом использовали C-метод окраски, предусматривающий обработку препаратов 5% раствором гидроксида бария, инкубацию в сбалансированном буферном растворе при 60°C, высушивание и кратковременную (2-5 мин) окраску раствором азур II-эозина [Summer A. T. et al., 1971].

Для количественного определения лимфоцитов, находящихся на разных этапах клеточного цикла, а также клеток в состоянии апоптоза, использовали метод лазерной проточной цитометрии с детекцией иммунофлуоресцентно окрашенных клеток, инкорпорирующих бромдезоксипуридин (БДУ), с использованием набора «FITC BrdU Flow Kit» («BD Pharmingen», США) [Endl E. et al., 1997]. Поскольку аналог тимидина БДУ инкорпорируется в синтезируемую ДНК, то пул клеток, окрашенных анти-БДУ-антителами, соответствует синтетической фазе клеточного цикла (S-фазе). Одновременная окраска клеток на общее содержание ДНК с использованием 7-амино-актиномицин D (7-AAD) позволяет с помощью двухцветной лазерной проточной цитометрии определить число клеток, инкорпорировавших БДУ и находящихся в состоянии апоптоза (суб-G₀/G₁-фаза), а также в других фазах клеточного цикла: предсинтетической G₀/G₁-фаза, синтетической S-фазе, предмитотической G₂/M-фаза, митотической M-фаза. Подготовленные суспензии клеток в полной питательной среде инкубировали в течение 72 часов (с добавлением ФГА) либо 120 часов (с добавлением БАГ). За 12 часов до окончания инкубации в пробы добавляли БДУ в конечной концентрации 10 мкмоль/мл. Дальнейшая подготовка проб для анализа проводилась согласно инструкции производителя набора. Анализ относительного количества (%) клеток, одновременно окрашенных 7-AAD (канал FL3) и анти-БДУ ФИТЦ-мечеными моноклональными антителами (канал FL1) проводили с помощью проточного цитометра «FACS Calibur» и программы «CellQuest» («Becton Dickinson», США).

Для более точного определения числа клеток в культурах, находящихся в фазе апоптоза, был использован набор APO-BRDU Kit («BD Pharmingen», США), который позволяет выявлять последний этап апоптоза – фрагментацию ДНК вследствие активации эндонуклеаз [Krysko D. V. et al., 2008]. Определение относительного количества (%) клеток, одновременно окрашенных пропидиум йодидом и ФИТЦ, проводили на проточном цитометре «FACS Calibur».

Наряду с основными сериями культуральных клеточных суспензий, из образцов крови здоровых доноров были подготовлены дополнительные серии

клеточных суспензий для экспериментального изучения влияния разных концентраций живых боррелий вида *B. garinii* на цитогенетический статус и активность апоптоза мононуклеарных клеток крови в условиях *in vitro*. *B. garinii* в разных концентрациях (1:10, 1:20, 1:50) вносили за 52 часа до окончания культивирования ФГА-стимулированных культур лейкоцитов. В подготовленных пробах выявляли кариопатологические изменения в лимфоцитах и анализировали патологические формы митоза, проводили хромосомный анализ лимфоцитов, определяли количество клеток в состоянии апоптоза по уровню фрагментации ДНК.

Для статистической обработки данных применяли стандартный пакет программ «Statistica 6.0» и «Microsoft Office Excel». Проверку нормальности распределения количественных показателей проводили с использованием критерия Колмогорова-Смирнова. Для оценки различий между выборками в случае нормального распределения использовали t-тест Стьюдента или непараметрические критерии Манна-Уитни и Уилкоксона. Для установления зависимостей между изучаемыми параметрами исследовали ранговую корреляцию Спирмена. Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез в исследовании принимался равным 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

В результате проведённого исследования было установлено, что общее количество лимфоцитов с цитогенетическими нарушениями у пациентов с острым и хроническим ИКБ значительно превышало соответствующие значения в группе здоровых лиц в среднем в 5,2 ($p < 0,01$) и 4,5 ($p < 0,01$) раза. При анализе спектра структурных aberrаций хромосом в лимфоцитах больных с острым ИКБ было выявлено шестикратное по сравнению с показателями контрольной группы повышение частоты хроматидных разрывов ($5,60 \pm 0,28\%$ против $0,91 \pm 0,08\%$, $p < 0,01$), среди которых преобладали хроматидные делеции и одиночные фрагменты, а также повышение в среднем в 5 раз частоты хромосомных разрывов ($1,62 \pm 0,14\%$ против $0,32 \pm 0,05\%$, $p < 0,01$) (Рисунок 1а). Анализ частоты клеток с изменённым числом хромосом в наборе у больных с острым ИКБ показал значительное повышение в сравнении с соответствующими контрольными значениями числа гипоплоидных ($3,90 \pm 0,24\%$ против $1,32 \pm 0,10\%$, $p < 0,01$) и полиплоидных клеток ($3,70 \pm 0,17\%$ против $0,25 \pm 0,03\%$, $p < 0,01$), а также появление метафазных пластинок с эндоредупликацией, которые отсутствовали в культурах реконвалесцентов и здоровых лиц (Рисунок 1б). Доля клеток с гипопloidией ($2,74 \pm 0,26\%$) и полиплоидией ($3,18 \pm 0,15\%$) в культурах лимфоцитов у пациентов с хроническим ИКБ также превышала контрольные значения ($1,32 \pm 0,10\%$, $p < 0,01$ против $0,25 \pm 0,03\%$, $p < 0,01$). Частота гиперплоидных лимфоцитов у больных с хроническим ИКБ ($1,23 \pm 0,13\%$) была значительно выше соответствующего показателя как в контрольной группе ($0,25 \pm 0,03\%$, $p < 0,01$), так и в группе больных с острым ИКБ ($0,20 \pm 0,02\%$, $p < 0,01$).

При анализе хромосомных препаратов на предмет структурных aberrаций было установлено, что сходные типы нарушений в одной или двух гомологичных хромосомах являлись районами с увеличенными участками первичной перетяжки, которые встречались только в клетках больных острым ИКБ, но при этом

отсутствовали у тех же пациентов в период реконвалесценции, а также у больных с хроническим ИКБ (Рисунок 1в). Использование методов дифференциальной окраски хромосом позволило нам определить, что эти нарушения локализовались в 9-й хромосоме.

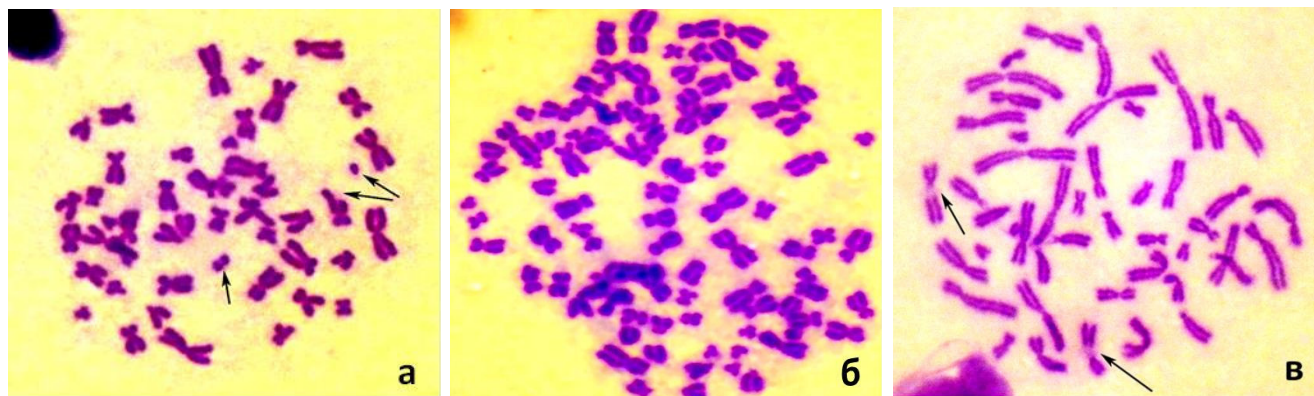


Рисунок 1 – Цитогенетические нарушения в культуре ФГА-стимулированных лимфоцитов периферической крови у больных с острым ИКБ: а – метафазная пластинка со структурными aberrациями хромосом (стрелками указаны хроматидная делеция, одиночный и парный фрагменты хромосом); б – полиплоидная клетка; в – структурные aberrации гомологичных хромосом. Окраска азур II-эозином, ув.1000.

Формирование анеуплоидии и полиплоидии в культурах лимфоцитов, полученных от больных острым и хроническим ИКБ, могло быть обусловлено отставанием хромосом в делящихся клетках, в связи с этим мы проанализировали частоту не только структурных и числовых хромосомных aberrаций в лимфоцитах, но и кариопатологические изменения. При анализе атипичных форм митозов лимфоцитов в ФГА-стимулированных культурах, у пациентов с острым ИКБ было выявлено повышение числа клеток с отставанием хромосом в метафазе (в среднем в 7,5 раза) либо в ана- и телофазе (в среднем в 3,7 раза) относительно параметров у здоровых доноров. Наряду с этим у пациентов в острый период инфекции было зарегистрировано повышение числа клеток с многогрупповой метафазой ($1,04 \pm 0,11\%$ против $0,20 \pm 0,03\%$ в контроле, $p < 0,01$) и с многополюсным митозом ($0,96 \pm 0,08\%$ против $0,22 \pm 0,03\%$ в контроле, $p < 0,01$). Аналогичные изменения были зарегистрированы и у пациентов с хроническим ИКБ, тогда как в группе реконвалесцентов морфологические параметры, характеризующие митотическое деление клеток, были сопоставимы с контрольными значениями. При анализе кариопатологических изменений лимфоцитов у больных острым и хроническим ИКБ было обнаружено увеличение в культуре клеток с микроядрами по сравнению с контрольными значениями в среднем в 6,4 ($p < 0,01$) и 4,9 ($p < 0,01$) раза соответственно. Наряду с этим выявлено статистически значимое увеличение числа полиплоидных и бинуклеарных лимфоцитов. В отдельных бинуклеарных клетках присутствовали и микроядра. Относительное количество лимфоцитов с кариопикнозом и кариорексисом (и/или кариолизисом), которые являются косвенными признаками апоптоза, оказалось более высоким по сравнению с

контрольными значениями только у пациентов с острой формой ИКБ ($6,50 \pm 0,31\%$ и $5,26 \pm 0,38\%$ против $0,52 \pm 0,11\%$, $p < 0,01$ и $0,60 \pm 0,09\%$, $p < 0,01$ соответственно в контроле). Добавление в ФГА-стимулированную культуру лимфоцитов здоровых доноров живых *B. garinii* индуцировало различные дозозависимые варианты кариопатологических изменений в клетках: образование микроядер, нарушение расхождения хромосом, структурные aberrации хромосом, а также анеуплоидию, полиплоидию и увеличение района вторичной перетяжки хромосомы 9, аналогичные тем цитогенетическим нарушениям в лимфоцитах, которые были установлены у пациентов с ИКБ в острый период заболевания. При этом повышение концентрации антигена приводило к достоверному увеличению числа клеток с различными типами цитогенетических нарушений, включая как хроматидные и хромосомные структурные aberrации, так и гипо- или полиплоидию. Кроме того, в нашем исследовании было впервые доказано, что добавление *B. garinii* в ФГА-стимулированную культуру лимфоцитов здоровых людей в условиях *in vitro* способно вызывать повышение частоты встречаемости клеток с патологией ядра. Так, в результате анализа различных типов патологии митоза лимфоцитов, индуцированных добавлением в ФГА-стимулированные культуры клеток здоровых лиц спирохет в соотношении 1:10, было установлено повышение, по сравнению с соответствующими показателями в интактном контроле, числа клеток с многогрупповой метафазой ($1,91 \pm 0,18\%$ против $0,20 \pm 0,12\%$, $p < 0,001$) и многополюсным митозом ($1,55 \pm 0,19\%$ против $0,22 \pm 0,08\%$, $p < 0,001$), а также относительного количества лимфоцитов с отставанием хромосом в метафазе ($4,60 \pm 0,71\%$ против $0,40 \pm 0,23\%$, $p < 0,001$) или ана- и телофазе ($2,83 \pm 0,38\%$ против $0,30 \pm 0,16\%$, $p < 0,001$).

Дисрегуляция в системе «пролиферация-апоптоз» является причиной нарушения количественного баланса эффекторных и регуляторных иммунных клеток и играет важную роль в патогенезе многих заболеваний (аутоиммунных, аллергических, инфекционных, опухолевых др.) [Зурочка А. В. и соавт., 2018; Луговая А. В. и соавт., 2019]. В результате анализа пролиферативной активности лимфоцитов в интактных (без добавления индуктора) 72-часовых и 120-часовых первичных культурах было установлено статистически значимое повышение числа клеток, трансформированных в бласты, у пациентов с острым ИКБ по сравнению с контрольными значениями. При этом в отличие от культур у здоровых лиц, у пациентов с острым ИКБ регистрировались более низкие значения показателя ФГА-стимулированной реакции бластной трансформации. Так, индекс стимуляции для ФГА (отношение уровня стимулированной к уровню спонтанной пролиферативной активности) у пациентов с острым ИКБ составил в среднем 20 единиц против 110 единиц у здоровых доноров. В результате определения методом проточной цитометрии количества клеток, инкорпорировавших БДУ, у больных с острым ИКБ было установлено статистически значимое повышение по сравнению с контрольными значениями числа клеток, находящихся в S- и G₂/M-фазах клеточного цикла в интактных культурах, при их снижении в ФГА-индуцированных пробах (Рисунок 2).

При этом количество лимфоцитов в фазе G_0/G_1 при остром ИКБ в ФГА-стимулированных культурах оказалось выше контрольных значений в среднем в 1,2 раза ($p < 0,01$), что косвенно может свидетельствовать об аресте клеточного цикла в G_1 -фазе при митогенной стимуляции. Полученные результаты могли бы трактоваться как снижение резерва функциональной активности лимфоцитов на фоне острой воспалительной реакции в период разгара инфекционного заболевания. Однако мы установили, что интенсивность пролиферативного ответа лимфоцитов в ответ на добавление специфического антигена (БАГ) у пациентов с острым ИКБ оказалась значительно более высокой, чем в контрольной группе, и составила 15,83 [13,78; 18,52]% против 0,54 [0,41; 0,66]%, $p < 0,001$. Аналогичные по направленности и степени выраженности изменения спонтанной, ФГА- и БАГ-стимулированной пролиферативной активности лимфоцитов в культуре были зарегистрированы и у пациентов с хронической формой ИКБ. Такая реакция в большей степени характерна для начального этапа иммунного ответа, характеризующегося образованием популяций лимфоцитов, имеющих рецепторы к боррелиозным антигенам.

Следует отметить, что активная пролиферация лимфоцитов в ответ на антиген боррелий у больных острым и хроническим ИКБ по сравнению с контрольной группой была также выявлена и при использовании метода проточной цитометрии иммунофлуоресцентно окрашенных клеток, инкорпорировавших БДУ. При этом наиболее часто лимфоциты в фазах S и G_2/M встречались в БАГ-стимулированных культурах у больных с хроническим течением ИКБ, тогда как в группе реконвалесцентов относительное количество лимфоцитов, находящихся в разных фазах клеточного цикла при 120-часовом культивировании *in vitro* без добавления антигена было сопоставимо с контрольными значениями.

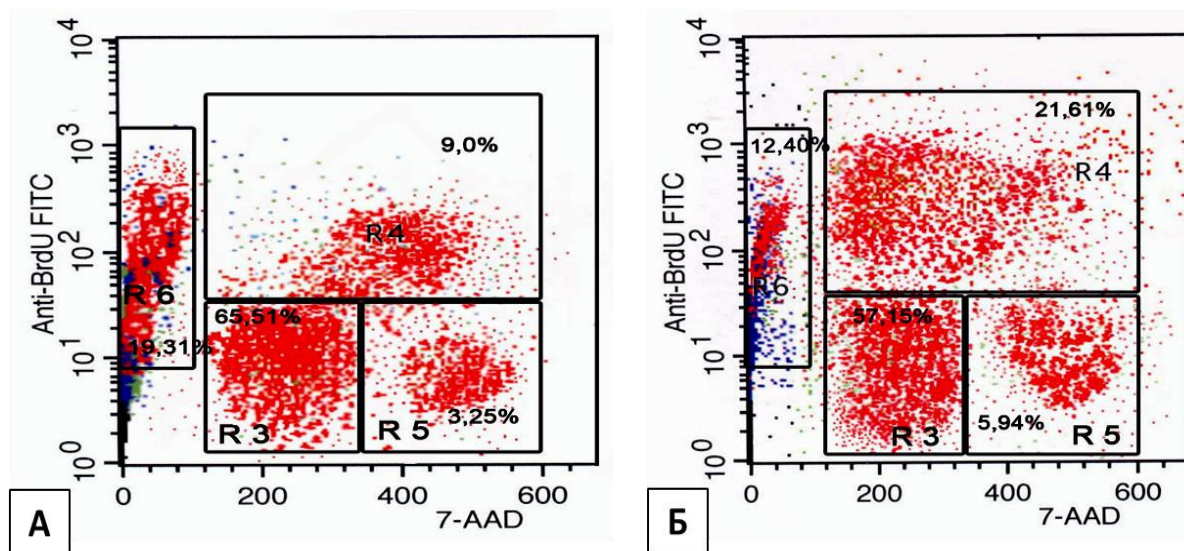


Рисунок 2 – Гейтирование популяций лимфоцитов, инкорпорировавших БДУ, находящихся в различных фазах клеточного цикла либо в состоянии апоптоза в ФГА-стимулированных культурах: А – у пациентов с острым ИКБ; Б – у здоровых доноров. Региону 3 (R3) соответствуют лимфоциты, находящиеся в G_0/G_1 -фазе клеточного цикла; R4 – в S-фазе; R5 – в G_2/M -фазе; R6 – лимфоциты в состоянии апоптоза (суб- G_0/G_1 фаза клеточного цикла). Данные о сигналах анти-БДУ ФИТЦ-меченных моноклональных антител (anti-BrdU FITC) отражены на Y-оси; данные о сигналах 7-AAD отражены на X-оси.

В культурах, индуцированных БАГ, количество клеток, находящихся в S- и G₂/M-фазах клеточного цикла, хотя и превышало значения в группе контроля в 3,7 и 2,5 раза соответственно, но было существенно ниже, чем у больных в острый период заболевания: доля лимфоцитов в S-фазе составила 7,28 [5,38; 10,09]% против 18,50 [16,66; 19,70]% в острый период инфекции ($p < 0,01$); доля клеток в G₂/M-фазе составила 1,83 [1,12; 2,65]% против 5,25 [3,52; 5,88]% в острый период инфекции ($p < 0,01$). Таким образом, как в период разгара, так и при хронизации инфекционного процесса при ИКБ лимфоциты в большей степени были способны отвечать на антиген-специфическую стимуляцию.

Цитокины являются основными факторами, которые регулируют пролиферативную активность лимфоцитов, при этом провоспалительные цитокины могут не только повышать, но и снижать функциональную активность клеток, действуя по принципу отрицательной обратной связи, например, путем индукции экспрессии ингибиторных молекул или посредством активации тирозинкиназ [Reid M. V. et al., 2002; Hodge D. R. et al., 2005; Ablamunits V. et al., 2010; Zhang L. et al., 2012]. В результате проведенного исследования цитокинпродуцирующей активности мононуклеарных лейкоцитов крови мы обнаружили повышение (относительно параметров контрольной группы и у здоровых реконвалесцентов) базальной, ФГА- и БАГ-индуцированной выработки провоспалительных цитокинов IFN- γ , TNF- α и IL-6 в культуре клеток, полученной от больных как с острым, так и с хроническим ИКБ.

Таким образом, регистрируемые изменения пролиферативной активности лимфоцитов (снижение антигеннеспецифической и повышение БАГ-индуцированной пролиферации) формируются на фоне гиперпродукции провоспалительных цитокинов, что свидетельствует о состоятельности механизмов межклеточной кооперации моноцитов (макрофагов) и лимфоцитов. Подтверждением этому являлись положительные корреляционные зависимости между количеством лимфоцитов, находящихся в фазах S и G₂/M клеточного цикла, и концентрацией IFN- γ в супернатантах соответствующих культур у больных острым ($r = +0,70$ и $+0,72$, $p < 0,01$) и хроническим боррелиозом ($r = +0,83$ и $+0,77$, $p < 0,01$). Наряду с этим у больных с острым ИКБ уровни спонтанной и стимулированной продукции IL-4 в культуре не отличались от контроля, а у пациентов с хронической формой заболевания концентрация БАГ- и ФГА-стимулированной секреции данного цитокина была ниже, чем в контрольной группе в среднем в 3 и 4 раза соответственно ($p < 0,01$). Таким образом, можно предположить, что стимуляция антигеном боррелий клеток, полученных от больных с острым и, в большей степени, с хроническим течением заболевания приводит к активации T-хелперов типа 1, что сопровождается активной выработкой IFN- γ .

Одновременная окраска клеток на общее содержание ДНК с использованием 7-AAD позволила нам с помощью двухцветной лазерной проточной цитометрии определить количество лимфоцитов, инкорпорировавших БДУ и находящихся в состоянии апоптоза (суб-G₀/G₁-фаза). Одной из особенностей ответа лимфоцитов на добавление в культуральную среду БАГ у пациентов с хроническим ИКБ было значительно более низкое количество клеток, находящихся в состоянии апоптоза по

сравнению с соответствующим показателем у здоровых лиц (в среднем в 2 раза) и пациентов с острым ИКБ (в среднем в 3 раза). Аналогичная картина наблюдалась и в культурах клеток, стимулированных ФГА. При этом, чаще всего клетки в состоянии апоптоза в интактных и ФГА-стимулированных культурах регистрировались в группе больных с острым ИКБ, что составило 12,40 [10,45;13,98]% и 19,31 [16,68; 21,68]% соответственно. Число клеток в состоянии апоптоза у больных хроническим ИКБ оказалось самым низким, при этом, в отличие от других групп, не было зарегистрировано статистически значимых внутригрупповых различий значений анализируемых параметров в интактных и ФГА-стимулированных культурах. В ФГА-стимулированных культурах лимфоцитов у больных с хроническим ИКБ регистрировалось низкое число клеток, находящихся в состоянии апоптоза по сравнению с соответствующими значениями в контрольной группе: 8,12 [7,59; 9,46]% против 12,38 [10,80; 13,75]% в контроле ($p < 0,01$).

Количественный анализ клеток, инкорпорировавших бром-дезоксисуридин трифосфаты (Br-dUTP) и одновременно окрашенных пропидиум йодидом и анти-БДУ ФИТЦ-мечеными моноклональными антителами, позволил определить относительное число клеток, находящихся в последней стадии апоптоза и имеющих фрагментацию ДНК вследствие активации эндонуклеаз, а также позволил отличить их от неапоптотически (некротически) погибших клеток. Так, у пациентов с острым ИКБ в культурах, стимулированных БАГ, относительное количество апоптотически погибших клеток было статистически значимо выше (в среднем в 2,1 раза), чем у здоровых доноров. У пациентов с хроническим ИКБ были зарегистрированы самые низкие значения для клеток, погибших путем апоптоза: 4,02 [1,88; 5,02]%. Следует отметить, что одной из особенностей ответа лимфоцитов на добавление в культуральную среду БАГ у пациентов с хроническим ИКБ было значительно более низкое количество клеток, находящихся в состоянии апоптоза (суб- G_0/G_1 -фаза) по сравнению с соответствующим показателем у здоровых лиц (в 2 раза, $p < 0,01$), пациентов с острым ИКБ (в 3 раза, $p < 0,05$) и реконвалесцентов (в 2,5 раза, $p < 0,001$). Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что мононуклеарные клетки больных хроническим ИКБ *in vivo* находятся в активированном состоянии. Не исключено, что активный пролиферативный ответ лимфоцитов обусловлен присутствием боррелий и их антигенов в организме пациентов с хроническим ИКБ. Повышенный пролиферативный ответ Т-лимфоцитов на антигены возбудителя при одновременном подавлении апоптоза реактивных клеток, по-видимому, отражает нарушение механизмов активационно-индуцированной клеточной смерти и может лежать в основе развития персистентно активированного Т-клеточного иммунного ответа и хронического воспалительного процесса при ИКБ.

Анализ результатов настоящего исследования с привлечением данных литературы позволяет представить концептуальную схему, демонстрирующую причинно-следственные отношения факторов, опосредующих цитогенетическую нестабильность, нарушение процессов пролиферации и апоптоза лимфоцитов периферической крови, а также их роль в механизмах врожденного и адаптивного

противоборрелиозного иммунного ответа при остром и хроническом течении ИКБ (Рисунок 3). В качестве факторов, предрасполагающих к хроническому течению боррелиозной инфекции, следует рассматривать: нарушение кооперативного взаимодействия клеток системы мононуклеарных фагоцитов и лимфоцитов вследствие дисбаланса продукции иммунорегуляторных цитокинов; снижение активности апоптоза реактивных клонов эффекторных субпопуляций лимфоцитов (CTL, В-лимфоцитов); недостаточность Treg-опосредованных механизмов иммуносупрессии. Полученные нами данные о характере нарушений цитогенетического статуса и функционального гомеостаза лимфоцитов при ИКБ и могут представлять интерес для разработки подходов к превентивной коррекции структурно-функционального статуса иммунокомпетентных клеток с целью профилактики хронизации боррелиозной инфекции.

При выполнении экспериментальной части исследования мы установили, что повышение концентрации *B. garinii* (были использованы концентрации 1:10, 1:20, 1:50) приводило к росту частоты апоптотически погибших клеток по сравнению с интактным контролем. Так, наибольшие значения, характеризующие относительное количество лимфоцитов, находящихся в состоянии апоптоза, были зарегистрированы в пробах с концентрацией спирохет 1:50 – 27,79 [24,01; 30,05]% при количестве клеток в интактных контрольных пробах 2,11 [1,98; 2,45]%, $p < 0,01$.

Выявленное нами цитопатическое воздействие *B. garinii* на лимфоциты периферической крови, выражающееся в дозозависимой индукции апоптоза, хромосомных aberrаций и нарушении нормального хода митоза, определяет перспективы дальнейшей разработки темы настоящего исследования. Несмотря на то, что вид *B. garinii* имеет наибольшее значение в эпидемиологии иксодовых клещевых боррелиозов в Российской Федерации, он является лишь одним из 9 видов патогенных для человека спирохет, ассоциированных с иксодовыми клещами и входящих в комплекс *B. burgdorferi sensu lato* [Рудакова С. А. и соавт., 2019]. На сегодняшний день известно о широкой антигенной вариабельности поверхностных мембранных белков (Osp-липопротеидов) боррелий, относящихся к разным видам. Это определяет не только различия в механизмах устойчивости возбудителя к факторам врожденного и адаптационного иммунитета (подавление реакций комплемент-зависимого фагоцитоза, модуляция цитокинового ответа иммунокомпетентных клеток), но и механизмы патогенности, которые отличаются у разных видов боррелий. Таким образом, перспективным представляется изучение особенностей иммунопатогенеза ИКБ в зависимости от видовой принадлежности и генотипических особенностей инфицирующего штамма боррелий для разработки способов дифференциальной диагностики, прогнозирования неблагоприятного течения и исходов заболевания, выявления групп риска по развитию прогрессирующих и хронических форм, профилактики и патогенетически обоснованной терапии боррелиоза и его осложнений.

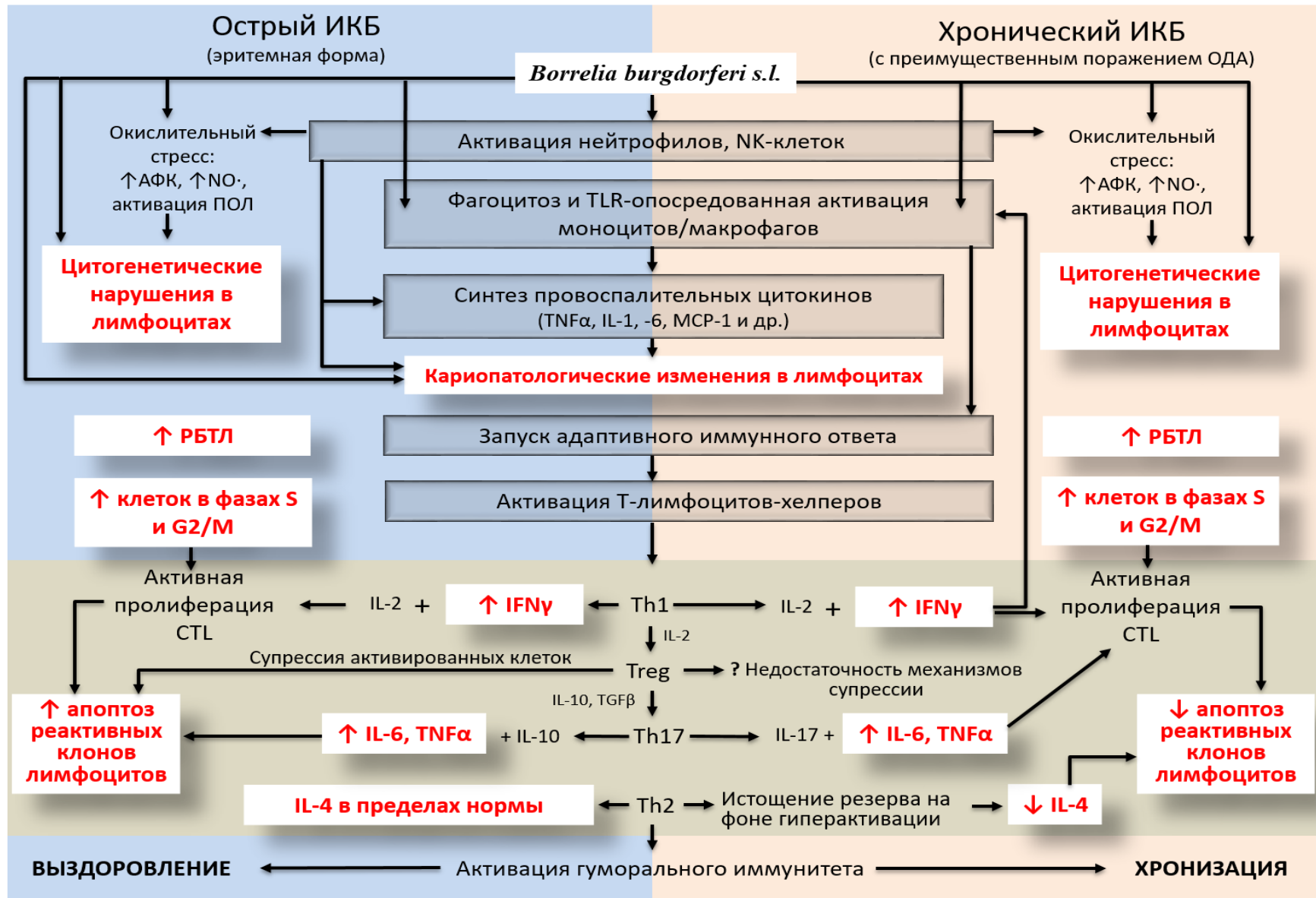


Рисунок 3 – Роль патогенетических факторов, характеризующих нарушения цитогенетического и функционального гомеостаза лейкоцитов периферической крови, в иммунопатогенезе боррелиозной инфекции (по данным литературы и результатам собственных исследований (выделено красным шрифтом)). ОДА – опорно-двигательный аппарат; АФК – активные формы кислорода; ПОЛ – перекисное окисление липидов; CTL – цитотоксические Т-лимфоциты (cytotoxic T cells); TGFβ – трансформирующий фактор роста β (transforming growth factor beta); Treg – Т-регуляторные лимфоциты; НК-клетки – натуральные киллерные клетки (natural killer cells).

ВЫВОДЫ

1. Острый и хронический ИКБ сопровождается повышением в среднем в 4,9 раза числа лимфоцитов с патологией митоза (отставание хромосом, микроядра, бинуклеары, многогрупповая метафаза, многополюсный митоз). Явления кариорексиса, кариопикноза и кариолизиса более характерны для острого периода боррелиоза, нежели для хронической инфекции, и сохраняются через 3 месяца после реконвалесценции.
2. У больных острым и хроническим ИКБ в среднем в 5,7 раза повышается общее количество лимфоцитов с цитогенетическими нарушениями: со структурными aberrациями хромосом преимущественно хроматидного типа (разрывы и фрагменты), с изменением числа отдельных хромосом (гипо- и гиперплоидия) и полиплоидией, что наиболее характерно для хронического течения инфекции. В остром периоде ИКБ выявляется aberrантный кариотип с увеличением прицентромерного района 9 пары гомологичных хромосом.
3. При остром и хроническом течении ИКБ выявлены однонаправленные изменения митотической активности лимфоцитов в культуре: повышение (по сравнению с нормой) интенсивности спонтанной и антиген-индуцированной пролиферации и низкий пролиферативный ответ на ФГА. Высокая апоптотическая активность лимфоцитов зарегистрирована в острый период боррелиозной инфекции, тогда как при хроническом ИКБ интенсивность апоптоза лимфоцитов в интактных и антиген-индуцированных культурах снижена более чем в 3 раза.
4. Влияние *B. garinii* на лимфоциты здоровых лиц в культуре *in vitro* зависит от концентрации и выражается в повышении числа клеток с патологией митоза (многогрупповая метафаза, многополюсный митоз, отставание хромосом), с цитогенетическими нарушениями (структурные и числовые хромосомные aberrации) и 2-кратном нарастании интенсивности апоптоза лимфоцитов при увеличении дозы антигена.
5. Изменения цитогенетического статуса, пролиферативной и апоптотической активности лимфоцитов, как при остром, так и при хроническом течении ИКБ происходят на фоне усиления (по сравнению с нормой) спонтанной и антиген-индуцированной выработки мононуклеарными лейкоцитами провоспалительных цитокинов IFN- γ , TNF- α , IL-6 в культуре *in vitro*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные в журналах перечня рецензируемых научных изданий (ВАК Минобрнауки РФ, RSCI, Scopus, Web of Science)

1. Пролиферативный ответ и продукция иммуноцитокинов мононуклеарными клетками периферической крови у больных иксодовым клещевым боррелиозом / Е. Н. Ильинских, А. Г. Семенов, И. Н. Ильинских, Е. А. Чередникова // **Имунопатология, аллергология, инфектология.** – 2011. № 4. С. 48-53. **Индексируется базой данных RSCI. Категория К-2. Импакт-фактор РИНЦ 0,338.**
2. Пролиферация и апоптоз лимфоцитов в ответ на стимуляцию боррелиозным антигеном у больных иксодовым клещевым боррелиозом / Е. Н. Ильинских, И. Н. Ильинских, А. Г. Семенов // **Бюллетень Сибирской медицины.** – 2012. – Т. 11,

- №4. – С. 32-38. **Индексируется базами данных RSCI, Web of Science, Scopus. Категория К-1. Импакт-фактор РИНЦ 0,643.**
3. Cytogenetic Aberrations in Peripheral Blood Mononuclear Cells in Acute Lyme Borreliosis Patients / E. N. Il'inskikh, I. N. Il'inskikh, A. G. Semenov // **Cytology and Genetics (Украина)**. – 2013. – Vol. 47, № 1. – P. 56-67. **Индексируется базой данных Scopus.**
 4. Генетический полиморфизм и цитогенетические изменения Т-лимфоцитов периферической крови у больных артритом, ассоциированным с иксодовым клещевым боррелиозом, в северных регионах Сибири / Н. Н. Ильинских, Е. Н. Ильинских, В. П. Зуевский, А. Г. Семенов // **Научно-практическая ревматология**. – 2017. – Т. 55, № 5. – С. 500-503. **Индексируется базами данных RSCI, Scopus. Категория К-1. Импакт-фактор РИНЦ 1,257.**
 5. Цитогенетические нарушения, индуцированные антигеном *Borrelia garinii* в лимфоцитах периферической крови здоровых людей в условиях *in vitro* / А. Г. Семенов, Е.Н. Ильинских, Н.Н. Ильинских // **Журнал медико-биологических исследований**. – 2018. – Т. 6, № 1. – С. 77-84. **Категория К-2. Импакт-фактор РИНЦ 0,556.**
 6. Роль иммуноцитоклинов в пролиферации и цитогенетических изменениях мононуклеаров периферической крови у больных иксодовым клещевым боррелиозом / Н. Н. Ильинских, А. С. Ксенц, А. Г. Семенов, Е.Н. Ильинских // **Успехи медицинской микологии**. – 2018. – Т. 18. – С. 430-433. **Импакт-фактор РИНЦ 0,057.**
 7. Мониторинг цитогенетических последствий в связи с генетическим полиморфизмом генов ДНК-лигазы IV и глутатион-S-трансферазы у больных иксодовым клещевым боррелиозом в северных регионах Сибири / Н. Н. Ильинских, Е. Н. Ильинских, А. М. Субботин, А. Г. Семенов // **Инфекционные болезни**. – 2018. – Т. 16, № 2. – С. 43-48. **Индексируется базами данных RSCI, Scopus. Категория К-1. Импакт-фактор РИНЦ 0,670.**
 8. Циркуляция возбудителя возвратной клещевой лихорадки *Borrelia miyamotoi* в природном очаге Томской области / О. В. Воронкова, Л. В. Лукашова, М. Р. Карпова, Е. Н. Ильинских, А. Г. Семенов, И. Е. Есимова, Е. А. Мотлохова, Н. А. Чернышов, И. Н. Ильянова // **Эпидемиология и инфекционные болезни**. – 2022. – Т. 27, № 1. – С. 15-22. **Индексируется базой данных RSCI. Категория К-1. Импакт-фактор РИНЦ 0,355.**
 9. Анализ параметров лейкограммы и цитокинового профиля крови при клещевых инфекциях разной этиологии / О. В. Воронкова, Е. Н. Ильинских, Р. Р. Хасанова, И. Е. Есимова, А. Г. Семенов, М. Р. Карпова, Е. А. Мотлохова, Н. А. Чернышов, А. В. Ямпольская, О. В. Ямпольская // **Инфекция и иммунитет**. – 2023. – Т. 13. – №. 2. – С. 338-346. **Индексируется базами данных RSCI, Scopus. Категория К-1. Импакт-фактор РИНЦ 1,019.**

Прочие публикации

10. Иммунореактивность лимфоцитов периферической крови больных острым иксодовым клещевым боррелиозом и клещевым энцефалитом / Е. Н. Ильинских,

- А. Г. Семенов // Труды VII Международной научно-практической конференции «Современные аспекты патогенеза, клиники, диагностики, лечения и профилактики протозоозов, гельминтозов и арахноэнтомозов человека, животных и растений», г. Витебск (Беларусь), 23-24 сентября 2010. – Витебск (Беларусь): ВГМУ. – С. 125-127.
11. Реакция бласттрансформации лимфоцитов периферической крови у больных с острой и хронической формами иксодового клещевого боррелиоза / Е. Н. Ильинских, И. Н. Ильинских, А. Г. Семенов, Н. С. Бужак, З. Ф. Пьяных, Н. В. Жарова // Инфекционные болезни. – 2010. – Том 8. – Приложение № 1. – С.130.
 12. Изучение стимулированной боррелиями продукции цитокинов в культурах лейкоцитов периферической крови у больных иксодовым клещевым боррелиозом / А. Г. Семенов, Е. Н. Ильинских, И. Н. Ильинских, Е. А. Файт, Н. Н. Пучкова, Е. А. Чередникова // Сборник тезисов Юбилейной научно-практической конференции, посвященной 115-летию первой в России кафедры инфекционных болезней военно-медицинской академии имени С.М. Кирова, г. Санкт-Петербург, 1-2 декабря 2011. – Санкт-Петербург: Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, 2011. – С. 167.
 13. Пролиферативный ответ и продукция иммуоцитокинов мононуклеарными клетками периферической крови у больных иксодовым клещевым боррелиозом / А. Г. Семенов, Е. Н. Ильинских, И. Н. Ильинских, Е. А. Файт, Н. Н. Пучкова, Е. А. Чередникова // Материалы межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы бактериологии», г. Томск, 23 -24 ноября 2011. – Томск: СибГМУ, 2011. – С. 66.
 14. Цитогенетические нарушения в мононуклеарных клетках больных острым и хроническим иксодовым клещевым боррелиозом / А. Г. Семенов // Материалы межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы бактериологии», г. Томск, 23 -24 ноября 2011. – Томск: СибГМУ, 2011. – С. 65.
 15. Активность районов ядрышкового организатора, реакция бластной трансформации и продукция иммуоцитокинов лимфоцитами периферической крови больных острым иксодовым клещевым боррелиозом / А. Г. Семенов // Материалы III Международной студенческой научно-практической конференции с участием молодых ученых «Клинические и теоретические аспекты современной медицины», г. Москва, 6-8 апреля 2011. – Москва: РУДН. – С.57.
 16. Иммунореактивность лимфоцитов периферической крови больных острым иксодовым клещевым боррелиозом / Е. Н. Ильинских, А. Г. Семенов // Инфекционные болезни. – 2011. – Том 9. – Приложение №1. – С.150.
 17. Оценка бластной трансформации лимфоцитов и продукции иммуоцитокинов в периферической крови у больных острым иксодовым клещевым боррелиозом / А. Г. Семенов // Сборник статей по материалам XII Российского конгресса молодых ученых с международным участием «Науки о человеке», г. Томск, 26-27 мая 2011. – Томск: СибГМУ. – 2011. – С.74-75.
 18. Реакция бластной трансформации и продукция иммуоцитокинов в культурах лимфоцитов периферической крови больных острым иксодовым клещевым

- боррелиозом / А. Г. Семенов // Материалы Научной конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные вопросы инфекционной патологии – 2011», г. Санкт-Петербург, 3-4 февраля 2011. – СПб.: СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, 2011. – С. 66.
19. Функциональная активность лимфоцитов у больных иксодовым клещевым боррелиозом / А. Г. Семенов // В мире научных открытий (Проблемы науки и образования). – 2011. – Т. 21, № 9.6. – С. 1781-1791.
20. Цитогенетические нарушения и гетероморфизм перицентромерного района 9 хромосомы лимфоцитов у больных острым иксодовым клещевым боррелиозом / А. Г. Семенов, Е. Н. Ильинских, И. Н. Ильинских, Е. А. Чередникова // Сб. тезисов VIII Международной конференции «Молекулярная генетика соматических клеток», г. Звенигород, 6-9 декабря 2011. – Звенигород–Москва, 2011. – С. 24-25.
21. Цитогенетические нарушения в мононуклеарных клетках крови больных иксодовым клещевым боррелиозом / Е. Н. Ильинских, И. Н. Ильинских, А. Г. Семенов, М. В. Шайтарова // Журнал инфекционной патологии (Иркутск). – 2012. – Т. 19, №3. – С.27.
22. Цитогенетические нарушения в мононуклеарных клетках периферической крови больных острым иксодовым клещевым боррелиозом / А. Г. Семенов, М. В. Шайтарова, Е. В. Сергеева, Д. С. Саенко // Материалы IV Международной научной конференции «SCIENCE4HEALTH 2012: Клинические и теоретические аспекты современной медицины», г. Москва, 18-21 апреля 2012. – Москва: РУДН, 2012. – С. 60.
23. Динамическое изменение активности ядрышкообразующих районов лимфоцитов больных иксодовым клещевым боррелиозом / Е. Н. Ильинских, И. Н. Ильинских, А. Г. Семенов, М. В. Шайтарова // Инфекционные болезни. – 2012. – Т. 10, Приложение №1. – С. 163.
24. Цитогенетический статус и полиморфизм хромосомы 9 у больных с иксодовым клещевым боррелиозом / Е.Н. Ильинских, И.Н. Ильинских, А.Г. Семенов, Е.А. Чередникова, Н.Н. Пучкова // Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биол., клин. медицина. – 2012. – Т. 10, вып. 3. – С. 87-94.
25. Зависимости между продукцией цитокинов, активацией окислительных процессов и индукцией цитогенетических нарушений у больных иксодовым клещевым боррелиозом / Е. Н. Ильинских, И. Н. Ильинских, Н. Н. Ильинских, А. Г. Семенов, А.В. Лепехин, Н.С. Бужак, Е.В. Портнягина, Н.Н. Пучкова // Аллергология и иммунология. – 2013. – Т. 14. №3. – С. 227.
26. Корреляционные зависимости между продукцией цитокинов, активацией окислительных процессов и индукцией цитогенетических нарушений у больных иксодовым клещевым боррелиозом / Е. Н. Ильинских, И. Н. Ильинских, Н. Н. Ильинских, А. Г. Семенов, А. В. Лепехин, Н. С. Бужак, Е. В. Портнягина, Н. Н. Пучкова // Журнал инфекционной патологии (Иркутск). – 2013. – Т. 20, № 1-4 – С.145-146.
27. Функциональная активность мононуклеарных клеток периферической крови у больных острым и хроническим иксодовым клещевым боррелиозом / И. Д.

- Пименов, А.Г. Семенов, Е. Н. Ильинских // Материалы V Международной научной конференции «SCIENCE4HEALTH 2013: Клинические и теоретические аспекты современной медицины», г. Москва, 29 октября – 2 ноября 2013. – Москва: РУДН, 2013. – С. 62.
28. Роль иммуноцитоклинов в изменении митотической активности мононуклеаров крови больных иксодовым клещевым боррелиозом / Е. Н. Ильинских, Н. Н. Ильинских, А. Г. Семенов // Сборник научных статей участников Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Новые и возвращающиеся инфекции», г. Уфа, 18 октября 2016. – Уфа: Автономная некоммерческая организация «Исследовательский центр информационно-правовых технологий», 2016. – С. 16-22.
29. Роль антигена *Borrelia garinii* в цитогенетических изменениях лимфоцитов крови в условиях *in vitro* / Н. Н. Ильинских, Е. Н. Ильинских, А. Г. Семенов // Сборник научных статей участников Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Новые и возвращающиеся инфекции», г. Уфа, 18 октября 2016. – Уфа: Автономная некоммерческая организация «Исследовательский центр информационно-правовых технологий», 2016. – С. 13-16.
30. Изучение продукции цитокинов в культурах мононуклеарных клеток, полученных от больных острым и хроническим иксодовым клещевым боррелиозом, в ответ на стимуляцию корпускулярным антигеном боррелий в условиях *in vitro* / Е. Н. Ильинских, А. Г. Семенов, Н. Н. Ильинских, Н. С. Бужак, Н. Н. Пучкова // Аллергология и иммунология. – 2017. – Т. 18, № 1. – С. 54-56.
31. Полиморфизм хромосомы 9 в лимфоцитах периферической крови на фоне иксодового клещевого боррелиоза / А. Г. Семенов, Е. Н. Ильинских, О. В. Воронкова, И. А. Осихов // Сборник материалов I Международного научного медицинского конгресса «Человек, его будущее в свете достижений современного естествознания», г. Кемерово, 28–30 октября 2021. – Кемерово: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 2021. – С. 357-363.
32. Особенности цитокинпродуцирующей активности мононуклеарных лейкоцитов в культуре *in vitro* при хроническом течении иксодового клещевого боррелиоза / А. Г. Семенов, О. В. Воронкова, Е. Н. Ильинских // Журнал инфектологии. – 2022. – Т. 14, № 4 S1. – С. 90-91.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

БАГ – боррелиозный антиген; БДУ – бромдезоксисуридин; ОИКБ – острый иксодовый клещевой боррелиоз; ИКБ – иксодовый клещевой боррелиоз; ИФА – иммуноферментный анализ; РБТЛ – реакция бластной трансформации; ФГА – фитогемагглютинин; ФИТЦ – флуоресцеин изотиоцианат; 7-ААД – 7-амино-актиномицин D; ХИКБ – хронический иксодовый клещевой боррелиоз; Osp – outer surface protein (поверхностные белки боррелий).