ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Семенов Альберт Геннадьевич

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

3.3.3. Патологическая физиология

Диссертация
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
доцент О.В. Воронкова

Томск – 2023 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ…….. 5

ВВЕДЕНИЕ…….……. 7

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ…….. 15

1.1 Роль мононуклеарных лейкоцитов в патогенезе острой и хронической боррелиозной инфекции…… 15

1.2 Механизмы нарушения баланса пролиферации и апоптоза мононуклеарных лейкоцитов при инфекциях…… 20

1.3 Феномен и механизмы цитогенетической нестабильности при бактериальных инфекциях……... 26

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ……... 33

2.1 Общая характеристика обследованных пациентов……..... 33

2.2. Методы исследования…….. 34

2.2.1 Оценка цитокинпродуцирующей активности мононуклеарных лейкоцитов при культивировании *in vitro*……. 36

2.2.2. Анализ пролиферативной активности лимфоцитов в реакции бластной трансформации……..... 37

2.2.3 Анализ кариопатологических изменений в лимфоцитах, выявление патологических форм митоза…… 38

2.2.4 Хромосомный анализ лимфоцитов……. 38

2.2.5 Определение количества клеток в разных фазах клеточного цикла и в состоянии апоптоза методом проточной цитометрии…… 40

2.2.6 Определение количества клеток в состоянии апоптоза по уровню фрагментации ДНК……..... 41

2.2.7 Экспериментальная оценка влияния живых *B. garinii* на цитогенетический статус и апоптотическую активность лимфоцитов крови здоровых лиц в условиях *in vitro*……. 42

2.2.8 Статистические методы анализа результатов …… 43

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ……..... 44

3.1 Анализ цитокинпродуцирующей активности мононуклеарных лейкоцитов при культивировании *in vitro*……. 44

3.2 Хромосомный анализ лимфоцитов, анализ кариопатологических изменений в лимфоцитах, выявление патологических форм митоза…… 48

3.2.1 Количество клеток с цитогенетическими нарушениями в ФГА-стимулированных культурах лимфоцитов периферической крови у больных с острым и хроническим ИКБ……..... 48

3.2.2 Количество клеток с цитогенетическими нарушениями в культурах лимфоцитов периферической крови здоровых лиц при добавлении живых боррелий……... 54

3.2.3 Анализ кариопатологических изменений, характеристика патологических форм митоза в лимфоцитах крови у больных с острым и хроническим ИКБ…… 56

3.2.4 Характеристика патологических форм митоза лимфоцитов у здоровых лиц при культивировании клеток *in vitro* с добавлением живых боррелий……..... 59

3.3 Анализ пролиферативной активности лимфоцитов в реакции бластной трансформации в ответ на стимуляцию БАГ и ФГА у больных с острым и хроническим ИКБ…….. 60

3.4 Результаты определения количества клеток, находящихся в разных фазах клеточного цикла и в состоянии апоптоза, методом проточной цитометрии у больных с острым и хроническим ИКБ.. 62

3.4.1 Анализ количества лимфоцитов, находящихся в разных фазах клеточного цикла при 120-часовом культивировании *in vitro* в присутствии БАГ…….. 62

3.4.2 Анализ количества лимфоцитов, находящихся в разных фазах клеточного цикла при 72-часовом культивировании *in vitro* в присутствии ФГА…….. 65

3.4.3 Результаты определения количества клеток в состоянии апоптоза

по уровню фрагментации ДНК в БАГ- и ФГА-индуцированных культурах лимфоцитов у больных с острым и хроническим ИКБ… 68
3.4.4 Анализ апоптотической активности лимфоцитов здоровых лиц в культуре *in vitro* при добавлении живых боррелий…… 71
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ…… 73
4.1 Кариопатологические изменения и цитогенетические нарушения в лимфоцитах крови у больных ИКБ…..... 73
4.2 Пролиферативная и апоптотическая активность лимфоцитов периферической крови у больных ИКБ…….….. 83
ВЫВОДЫ……... 94
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ…… 96

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АИКС – активационно-индуцированная клеточная смерть

АТФ – аденозинтрифосфат

БАГ – боррелиозный антиген

БДУ – бромдезоксиуридин

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИКБ – иксодовый клещевой боррелиоз

ИФА – иммуноферментный анализ

КЭ – клещевой энцефалит

НАД – никотинамид

НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

ОИКБ – острый иксодовый клещевой боррелиоз

РБТЛ – реакция бластной трансформации

ФГА – фитогемагглютинин

ФИТЦ – флуоресцеин изотиоцианат

ХИКБ – хронический иксодовый клещевой боррелиоз

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

7-AAD – 7-амино-актиномицин D

Cdk – циклин-зависимые киназы (cyclin-dependent kinases)

CD – дифференцировочный антиген лейкоцитов человека (cluster of differentiation, cluster designation)

CDT – цитолетальные токсины (cytolethal distending toxin)

CR – рецептор комплемента (complement receptor)

Cyc – белки-циклины (cyclin)

DISC – апоптоз-индуцирующий сигнальный комплекс (death-inducing signal complex)

FADD – Fas-ассоциированные с доменами смерти протеины (Fas-associated death domain protein)

H_2O_2 – пероксид водорода

HSF1 – транскрипционный фактор теплового шока 1 (heat shock transcription factor

1)

IFN-γ – интерферон-γ

IgA, IgE, IgG и IgM – иммуноглобулины классов A, E, G и M

IL – интерлейкин (interleukin)

iNOS – индуцибельная синтаза оксида азота

M-CSF – макрофагальный колониестимулирующий фактор (macrophage colony-stimulating factor)

MHC – главный комплекс гистосовместимости (major histocompatibility complex)

MyD88 – миелоидный фактор дифференцировки 88

NF-κB – ядерный фактор-каппа B (nuclear factor-kappa B)

NO – оксида азота

O_2^- – супероксид-анион радикал

OH^- – гидроксильный радикал

Osp – поверхностные белки (outer surface protein)

PAMP – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (pathogen-associated molecular patterns)

TCR – Т-клеточный рецептор (T cell receptor)

TLR – Toll-подобный рецептор (toll-like receptor)

TNF-α – фактор некроза опухоли-α (tumor necrosis factor alpha)

ВВЕДЕНИЕ

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 пролифераций, 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 [Bocchino 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 развиться 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 субпопуляционого 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 иммуноциты, 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 аберрациями (преимущественно хроматидного типа) и клеток с патологией ядра вследствие нарушения нормального хода митоза. У пациентов в острый период боррелиозной инфекции впервые был выявлен аберрантный 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 наработки 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 аберраций 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 (фитогемагглютинина и корпускулярного боррелиозого 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 аберраций.

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 наработки 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», «Индуцированный 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.

Объём 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Роль мононуклеарных лейкоцитов в патогенезе острой и хронической боррелиозной инфекции

Наиболее распространенным трансмиссивным механизмом заражения человека патогенными боррелиями является инокуляционный путь передачи возбудителя. В месте присасывания клеща боррелии попадают в кожу, где взаимодействуют с многочисленными факторами врожденного звена иммунорезистентности. Поверхностные антигены боррелий (p83/100, Oms66 (p66), BmpA (p39), HSP60 (p60), p18, OspD, OspE, OspF и др.) запускают альтернативный путь активации комплемента, в результате чего нарабатываются компоненты C3a, C5a, C3, обладающие опсонизирующей и хемотаксической активностью. В коже боррелии взаимодействуют, прежде всего, с внутриэпидермальными макрофагами (дендритными клетками) – клетками Лангерганса, которые содержат многочисленные клеточные поверхностные рецепторы (лектиновый рецептор лангерина (CD208), рецепторы к фрагментам комплемента и др.) и другие мембрано-ассоциированные белки (интегрины, костимулирующие молекулы и др.) [Schramm F. et al., 2012]. Макрофаги обладают фагоцитарным и сигнальным механизмом, необходимым для связывания, поглощения и разрушения боррелий, и, таким образом, представляют собой афферентное иммунное звено.

В процессе контактного взаимодействия антигены боррелий (триацилированные липопротеины, флагеллин, пептидогликаны и зимозан) распознаются Toll-подобными рецепторами 2 (TLR2) и 3 (TLR3) на фагоцитах. Нисходящая передача сигналов TLR2 и TLR3 осуществляется через миелоидный фактор дифференцировки 88 (MyD88)-зависимый и MyD88-независимый пути, включающие, среди прочего, фосфоинозитид-3-киназу (PI3K) как важный триггер полимеризации актина [Verhaegh D. et al., 2017; Benjamin S. J. et al., 2021].

Фагоциты могут связывать опсонизированные иммуноглобулинами боррелии через Fcγ-рецептор [Carreras-González A. et al., 2019]. Макрофаги могут

прикрепляться также к неопсонизированным боррелиям, однако опсонизация специфическими антителами или фрагментами комплемента увеличивает скорость адгезии в 4 раза [Linder S. et al., 2001]. В ряде исследований показано, что дефицит TLR2, CR3 или FcγR на поверхности макрофагов приводит к нарушению процессов нейтрализации боррелий и усугубляет клиническое течение инфекции [Montgomery R. R., Malawista S. E., 1994; Lawrenz M. B. et al., 2003; Wang G. et al., 2004].

В ряде случаев клеточные и гуморальные факторы врожденного иммунитета не способны полностью справиться с возбудителем. Это связано как с индивидуальными особенностями функционального фенотипа клеток системы мононуклеарных фагоцитов, так и со способностью боррелий противостоять факторам неспецифической защиты. Установлено, что боррелии способны угнетать комплементзависимый фагоцитоз посредством значительной модификации своих поверхностных антигенов OspE, OspF и др. [Dulipati V. et al., 2020; Skare J. T., Garcia B. L., 2020].

Измененные антигены активируют плазменный фактор H, который, в свою очередь, связывает C3b, ускоряет разрушение C3-конвертазы альтернативного пути активации комплемента (C3bBb), а также действует как кофактор для протеолитической инактивации C3b. При этом незавершенный фагоцитоз способствует лимфогенной и гематогенной диссеминации боррелий из места первичной локализации в коже, а сосудистые реакции на вазоактивные вещества, продуцируемые фагоцитами в области воспаления, во многом способствуют проникновению боррелий в кровеносное русло [Garcia B. L., 2020].

После рецептор-опосредованного распознавания боррелии захватываются выростами макрофагальной мембраны (филоподиями) и интернализуются внутрь клетки с образованием фагосомы [Naj X., Linder S., 2016]. Внутри фаголизосомы при участии гидролитических ферментов осуществляется протеолитический процессинг боррелий [Klose M. et al., 2021].

Активный фагоцитоз и лизис спирохет сопровождается наработкой ферментов, вазоактивных веществ, активных форм кислорода, цитокинов и

хемоаттрактантов, способствующих направленной миграции в очаг воспаления внутрисосудистого пула фагоцитов, включая моноциты и нейтрофильные гранулоциты [Salazar J. C. et al., 2003]. Реализованный внутриклеточный сигнал с TLR активирует транскрипционный фактор NF-kB, который регулирует экспрессию генов провоспалительных цитокинов (TNF-a, IL-1, IL-6 и др.) и хемокинов (MCP-1, MCP-3, GM-CSF и др.) [Kumar V., 2020; Duan T. et al., 2022; Hammond E. M. et al., 2022]. В одном из экспериментов было показано, что мононуклеарные клетки периферической крови, культивируемые с живыми *Borrelia burgdorferi*, экспрессировали и высвобождали ряд провоспалительных цитокинов (IFN-γ, IL-12, IL-6, IL-1, IL-8, TNF-α), продукция которых была опосредована NF-kB- и MyD88-сигналингом, что также свидетельствует о важной роли TLR-рецепторов в процессах распознавания антигенных детерминант боррелий [Petzke M. M. et al., 2009].

Подключение адаптивного звена иммунной защиты при боррелиозной инфекции происходит после фагоцитоза боррелий антигенпрезентирующими клетками и представления ими антигенных детерминант Т-лимфоцитам в составе комплексов пептид-МНС II. Кооперативное взаимодействие макрофагов и лимфоцитов, опосредованное цитокинами, обеспечивает накопление коммитированных Т-лимфоцитов-хелперов, обеспечивающих образование в лимфоидных органах необходимого пула плазматических клеток, синтезирующих антитела к антигенам боррелий. Антимикробный гуморальный иммунитет при ИКБ в основном обеспечивают IgM и IgG, меньшее значение имеют IgA и IgE. Концентрация IgM достигает максимума к 4-6 неделе от момента инфицирования и постепенно снижается к 8-10 неделе [Миноранская Н. С., 2014].

В ряде исследований было показано, что эффективная элиминация боррелий связана с ранним и сильным воспалительным ответом Th1-лимфоцитов, уравновешенным противовоспалительными реакциями, и несколько отсроченным включением Th2 – опосредованных иммунных реакций [Скрипченко Н. В., Балинова А. А., 2012; Shemenski J., 2016].

G. B. Schoeler и соавт. (1999) при экспериментальном инфицировании

генетически восприимчивой (C3H/HeN) и обычной (BALB/c) линий мышей исследовали кинетику продукции IFN-γ и IL-4 Т-клетками лимфатических узлов в динамике развития боррелиозной инфекции. На 2-е сутки после инфицирования высокая концентрация IFN-γ была зарегистрирована у мышей BALB/c, тогда как у группы животных линии C3H/HeN уровень цитокина возрастал лишь к 14 дню эксперимента. Для концентрации IL-4 была обнаружена противоположная динамика – уровень цитокина у генетически восприимчивых к инфекции животных был значительно выше, чем у обычных мышей на 2-е сутки эксперимента. Корреляция уровней цитокинов с выраженностью клинических проявлений инфекции у экспериментальных животных позволила сделать вывод о том, что состоятельность иммунного ответа определяется ранним включением Th1-лимфоцитов и более поздним вовлечением в иммунные реакции Th2-клеток [G.B. Schoeler et al., 1999].

Роль Th1-лимфоцитов в иммунопатогенезе боррелиозной инфекции в большей степени определяется их способностью оказывать стимулирующее действие на фагоцитоз посредством синтеза цитокинов (IFN-γ, IL-12), активирующих макрофаги, поскольку цитотоксические лимфоциты (CD8+) не оказывают проективного действия в отношении бактерий с преимущественно внеклеточной локализацией [Jarefors S. et al., 2007; Скрипченко Н. В., Балинова А. А., 2012]

В процессе защитной воспалительной реакции со стороны организма большинство боррелий элиминируется. Основными причинами перехода болезни к хроническому течению служат замедленный иммунный ответ, связанный с относительно поздней и слабо выраженной боррелиемией, развитие аутоиммунных реакций и возможность внутриклеточной персистенции возбудителя в эндотелиоцитах и клетках системы мононуклеарных фагоцитов [Бикетов С. Ф. и соавт., 2009].

Фазность цитокиновой регуляции в процессе кооперативного взаимодействия мононуклеарных лейкоцитов на фоне боррелиозной инфекции должна проявляться закономерным компенсаторным увеличением продукции

антиинфламматорных цитокинов, способствующих купированию воспалительного процесса. Сохранение высоких уровней провоспалительных цитокинов IL-1β и TNF-α после перенесенной эритемной формы болезни является прогностическим фактором хронизации заболевания [Миноранская Н. С., 2014].

Избыточная провоспалительная активность клеток системы мононуклеарных фагоцитов при хроническом течении боррелиозной инфекции подтверждена многими исследованиями. Например, было установлено, что дендритные клетки пациентов с хроническим нейроборрелиозом и хроническим атрофическим акродерматитом (ХААД), трансформированные из моноцитов крови, при культивировании *in vitro* продуцируют TNF-α и IFN-γ в более высоких концентрациях, чем у здоровых лиц, серонегативных в отношении боррелиоза [Sjöwall J. et al., 2005]. Так, у пациентов с хроническими формами болезни Лайма, в частности, с ХААД, регистрируется неизменно высокий уровень IFN-γ без повышения IL-4 [Müllegger R. R. et al., 2000]. H. Yssel на примере Лайм-артрита показал, что у людей с преобладанием Th1-иммунного ответа развиваются прогрессирующие формы заболевания суставов [Yssel H. et al., 1991]. Установлено также, что течение хронического Лайм-артрита ассоциировано не только с повышенной активностью Т-хелперов типа 1 и гиперсекрецией ими IFN-γ, но и избыточной наработкой провоспалительного IL-17, который является продуктом Th-17-лимфоцитов. Последние играют ключевую роль в патогенезе широкого спектра иммуновоспалительных заболеваний, которые характеризуются системным поражением соединительной ткани [Nardelli D. T. et al., 2008].

Таким образом, от активности факторов неспецифической защиты, клеточного и гуморального иммунного ответа организма хозяина зависит не только предотвращение диссеминации боррелий из первичного очага и их элиминация в острый период инфекции, но и вероятность длительной персистенции спирохет в организме с развитием хронического иммунологически опосредованного воспаления в органах и тканях. Клетки системы мононуклеарных фагоцитов являются частью врожденной иммунной системы и одними из первых сталкиваются с инфицирующими боррелиями. Как профессиональные фагоциты

они способны к распознаванию, поглощению, внутриклеточному процессингу и окончательной элиминации боррелий. Эффективность фагоцитоза боррелий зависит от целого комплекса синергетически действующих рецепторов и сигнальных путей, которые играют решающую роль в инициации адаптивного иммунного ответа. Доминирование ответа Т-хелперов типа 1 и гиперпродукция IFN-γ в острый период заболевания имеет важное значение для эрадикации боррелий, однако для благоприятного исхода заболевания необходимо ограничение воспалительного процесса, обусловленное переключением на гуморальный тип иммунного ответа, а также поддержание оптимального баланса Т-хелперных клонов лимфоцитов [Бикетов С. Ф. и соавт., 2009; Скрипченко Н. В. и соавт., 2012].

1.2 Механизмы нарушения баланса пролиферации и апоптоза мононуклеарных лейкоцитов при инфекциях

Динамический процесс поддержания оптимального пула циркулирующих Т-лимфоцитов включает, с одной стороны, регулярное его пополнение за счёт митоген-активированной пролиферации либо выхода прошедших селекцию в тимусе клеток, а с другой – постоянное снижение числа периферических Т-клеток в результате их апоптотической гибели. Таким образом поддерживается баланс общего числа Т-лимфоцитов приблизительно на постоянном уровне [Anstee N.C. et al., 2017]. Реализация альтернативных программ клеточной активации зависит от характера экстраклеточных регуляторных сигналов, их интенсивности, продолжительности их воздействия, состояния клетки и её микроокружения. Покоящиеся Т-лимфоциты устойчивы к апоптозу, вероятно, вследствие повышенной экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2 и родственных молекул. По мере активации и последовательного вступления в митотический цикл Т-лимфоциты становятся значительно более чувствительными к апоптогенным факторам. При этом в ряде случаев усиление апоптоза является следствием повреждения клеток реактивными метаболитами азота и кислорода, литическими

продуктами цитотоксических лимфоцитов (перфорин, гранзим B и др.), белками теплового шока, мутагенами и ксенобиотиками [Тюкавкина С. Ю., 2013; Anstee N. C. et al., 2017].

Апоптоз инфицированных иммуноцитов, который, в отличие от некроза, не приводит к воспалительным последствиям и повреждению других клеток, можно считать успешной стратегией иммунной системы, направленной на элиминацию возбудителя. Значительное число внеклеточных и внутриклеточных патогенов индуцируют апоптоз клеток-мишеней, в то время как некоторые другие инфекционные агенты, напротив, подавляют апоптоз [Bocchino M. et al., 2005]. Влияние на апоптоз иммуноцитов считается ключевой стратегией инвазии, используемой внутриклеточными патогенами, например, возбудителем туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* [Persson A. et al., 2009]. Установлено, что в определенных условиях фагоцитированные микобактерии для того чтобы размножаться и персистировать в макрофагах способны задерживать их апоптоз и подавлять провоспалительную активацию [Persson A. et al., 2009].

Установлено, что при ряде вирусных инфекций происходит индукция апоптоза нормальных Т-лимфоцитов при одновременной защите от клеточной гибели инфицированных клеток для обеспечения пролонгированной персистенции патогена. Доказано, что эти процессы опосредованы участием определённых белков вирусов: вируса иммунодефицита человека (белок Tat), вируса Эпштейна-Барр (LMP-1 белок), аденовируса (E1B белок) или вируса коровьей оспы (белок серпин) [Мустафин И. Г., 2005; Barros M. H. M. et al., 2019; Jabea Ekabe C. et al., 2022]. Так, в культурах мононуклеарных клеток, полученных у больных хроническим гепатитом С, по сравнению с контролем (здоровые лица), было существенно увеличено количество растворимых sFas и sFasL и подавлена экспрессия Fas-рецепторов на поверхности клеток, что коррелировало с вирусной нагрузкой и тяжестью синдрома цитолиза. Это свидетельствовало о подавлении апоптоза лимфоцитов, способствующего поддержанию воспалительного ответа и длительной персистенции патогена [Grzanka R. et al., 2019].

Нарушение регуляции апоптоза рассматривается как одна из важнейших

причин дисфункции моноцитов и лимфоцитов при бактериальном сепсисе [Норкин М. Н., Леплина О. Ю., 2000; Ayala A. et al., 2007; Lu G. et al., 2022]. Установлено, что сепсис, особенно протекающий в тяжелой форме и сопровождающийся развитием «иммунного паралича», ассоциирован с интенсивным апоптозом циркулирующих лимфоцитов [Bahar I. et al., 2018]. При этом некоторые вне- и внутриклеточные бактерии и их липопротеины (*Serratia marcescens, Corynebacterium diphtheriae, Mycobacterium tuberculosis, Shigella flexneri, Leptospira interrogans*) способны нарушать процессы регуляции апоптоза в клетках человека [Тюкавкина С. Ю., 2013; Konecka E. et al., 2019; Weerasekera D. et al., 2018].

Апоптоз иммуноцитов при инфекционном процессе необходим для разрешения воспаления путём устранения повреждённых или гиперстимулированных клеток [Anstee N. C. et al., 2017]. Делеция реактивных Т-лимфоцитов вне тимуса посредством апоптоза имеет важное значение для поддержания толерантности к собственным антигенам и поддержания гомеостаза иммунной системы. Данный механизм применяется для контроля аутоиммунных реакций и поддержания оптимального пула иммунокомпетентных клеток [Anstee N. C. et al., 2017].

Апоптоз Т-лимфоцитов реализуется в результате передачи сигналов по двум основным путям – рецептор-опосредованному и митохондриальному [Budd R. C., 2002; Jangalwe S. et al., 2019]. Первый путь реализуется в ходе антигенной активации Т-клеток, экспрессирующих множество цитокиновых рецепторов, от стимуляции которых зависит их пролиферация и, в целом, выживание. Этот механизм, известный как активационно-индуцированная клеточная смерть (АИКС), запускается в результате повторной стимуляции Т-клеточных рецепторов (TCR) антигеном [Huan T. et al., 2022]. Индукция АИКС ассоциирована со взаимодействием лигандов Fas (FasL/CD95L), которые экспрессированы на цитотоксических Т-клетках, моноцитах и нейтрофилах, с трансмембранными белками-рецепторами Fas (CD 95/APO-1), представленными на большинстве типов клеток, включая активированные (нецитотоксические) Т- и В-лимфоциты [Krammer P. H., 2000]. Fas/CD95-рецепторы, согласно классификации, относят к

суперсемейству рецепторов фактора некроза опухоли (TNF-R). Известно, что при взаимодействии FasL с рецептором Fas происходит олигомеризация Fas с участием Fas-ассоциированных с доменами смерти протеинов (белки FADD), приводящая к формированию апоптоз-индуцирующего сигнального комплекса DISC (death-inducing signal complex), что приводит к активации прокаспазы-8 и запуску процесса апоптоза в клетке [Peter M. E., 2003; Kumar S. et al., 2022]. С другой стороны, было показано, что активация прокаспазы-8 может происходить при распознавании Т-клеточным рецептором комплекса антиген-МНС на поверхности антигенпрезентирующей клетки, что приводит к процессу, обратному апоптозу – к пролиферации и активации Т-лимфоцитов. При этом происходит стимуляция белка c-FLIP (клеточный FADD-подобный IL-1β-конвертирующий фермент-ингибиторный протеин (cellular Fas-associated death domain-like interleukin-1-β-converting enzyme-inhibitory protein) и повышение экспрессии цитоплазматического фактора транскрипции NF-κB, инициирующего пролиферативный ответ Т-лимфоцитов на антиген [Peter M. E., 2003]. Было установлено, что мутации у трансгенных мышей или наследственные мутации у людей, связанные с дефектами Fas/CD95-рецепторов или FasL, ассоциируются с подавлением процесса апоптоза лимфоцитов и с развитием аутоиммунного лимфопролиферативного синдрома [Seyrek K. et al., 2022] с прогрессирующей лимфоаденопатией и спленомегалией у экспериментальных животных [Watanabe-Fukunaga R. et al., 2012].

Когда воспалительный ответ угасает, и продукция цитокинов снижается, то запускается митохондриальный путь, направленный на устранение активированных Т-лимфоцитов [Jangalwe S. et al., 2019]. При этом активируется ряд генов, одним из которых является ген IL-1β-конвертирующих ферментоподобных протеаз (ICE, interleukin-1-β-converting enzyme). Продукты генов *bax* и *bad* взаимодействуют с антиапоптотическим протеином Bcl-2, приводя к его инактивации, тем самым индуцируя повышение проницаемости наружной митохондриальной мембраны и высвобождение цитохрома *c* из митохондрий, который формирует комплекс с адаптерной молекулой Apaf-1, что активирует прокаспазу-9 и образует апоптосому. Экспрессия генов *c-myc* и *p53*, которые

активируются в ответ на повреждение ДНК, также имеет значение в инициации процесса апоптоза [Jangalwe S. et al., 2019].

Оба сигнальных пути апоптоза (митохондриальный и Fas/FasL-ассоциированный) играют частично дублирующую и перекрестную роль в поддержании гомеостаза Т-лимфоцитов, а их относительный вклад в той или иной ситуации зависит от того, какой характер (острый или хронический) имеет иммунный ответ [Jangalwe S. et al., 2019]. В случае острого иммунного ответа, апоптоз преимущественно запускается в результате подавления продукции цитокинов в фазу разрешения иммунного ответа на инфекционный патоген или введённый иммуноген [Krammer P. H., 2000; Sprent J, Tough D. F., 2001]. Это нашло своё подтверждение в экспериментах, в которых было показано, что угасание острого Т-клеточного ответа на вирус простого герпеса-1 у трансгенных животных происходило только за счет инициации митохондриального пути апоптоза, тогда как в случае хронической инфекции в реализации апоптоза антиген-стимулированных Т-лимфоцитов были задействованы оба механизма – Fas-опосредованный и митохондриальный [Jangalwe S. et al., 2019]. Таким образом, было установлено, что вклад в предотвращение развития хронического инфекционного процесса и аутоиммунной патологии вносят оба сигнальных пути апоптоза эффекторных Т-лимфоцитов [Jangalwe S. et al., 2019].

Патогенные бактерии могут влиять на апоптоз опосредованно, вмешиваясь во внутриклеточные сигнальные пути (например, NF-κB-опосредованный) и непосредственно воздействовать на отдельные звенья апоптотического каскада (мембрану митохондрий и каспазы) [Фрейдлин И. С. и соавт., 2020].

Например, было установлено влияние патогенов на процессы апоптоза через связывание PAMP и других бактериальных факторов с рецепторами PRRs, FasL, TNF-R1, Apo2/Apo3 на клетках организма-хозяина [Ruckdeschel K. et al., 2004].

Нередко воздействие бактериальных факторов патогенности обусловлено их влиянием на экспрессию регулирующих апоптоз Bcl-белков [Häcker G., 2018]. Например, апоптоз макрофагов при инфицировании *Neisseria gonorrhoeae*, обусловлен влиянием токсина PorB, который нарушает проницаемость мембраны

митохондрий и активирует проапоптотический белок BH3 [Massari P. et al., 2003]. Индукция апоптоза клеток иммунной системы организма хозяина является одной из стратегий *S. pyogenes*. Инфекция, вызванная стрептококками группы А (GAS, group A streptococcus), индуцирует апоптотическую гибель макрофагов за счет активации матриксных металлопротеаз стрептококковой цистеиновой протеазой SpeB [Kwinn L. A., Nizet V., 2007]. На мышиной модели GAS-инфекции было показано, что SpeB индуцирует продукцию в макрофагах проапоптотических TNF-α и FasL и активацию генов, кодирующих каспазы 1, 9, 14. При этом наблюдалось уменьшение популяции макрофагов и выживание патогенных стрептококков [Hamada S. et al., 2015].

Показано также, что стрептолизин О, который является одним из факторов вирулентности стрептококка, способен активировать апоптоз макрофагов *in vitro* за счет ремоделирования и деполяризации мембран митохондрий, с выделением цитохрома С и активацией каспаз [Timmer A. M., et al. 2009].

A.O. Aliprantis с соавт. (2000) было впервые показано, что боррелиозные липопротеины оказывают проапоптотический эффект на фибробласты в культуре. Добавление живых *B. afzelii* существенно стимулировало апоптоз фибробластов, опосредованный Fas-ассоциированными доменами смерти и каспазой 8 [Aliprantis A.O. et al., 2000]. В сравнении с боррелиями, *Bartonella henselae* и, в особенности, *Coxiella burnetii*, напротив, индуцировали значительное подавление апоптоза клеток в те же сроки культивирования [Chmielewski T. et al., 2019]. Было установлено, что боррелии, заключенные в фагосомы, способны индуцировать определённые цитозольные сигналы, которые приводят к усилению NF-κB-зависимой продукции провоспалительных цитокинов, активации лимфоцитов, сборке инфламмасомы и к индукции апоптоза [Cruz A. R. et al., 2008]. Таким образом, апоптоз моноцитов, инициированный фагоцитированными боррелиями, является следствием активации, прежде всего, внутренних путей программированной клеточной гибели [Kirschnek S. et al., 2005; Lin J. et al., 2019; Mulcahy M. E. et al., 2020].

1.3 Феномен и механизмы цитогенетической нестабильности при бактериальных инфекциях

В научной литературе имеются данные, свидетельствующие о возможности различных инфекционных и паразитарных агентов (вирусов, бактерий, простейших и гельминтов) индуцировать цитогенетические нарушения в клетках организма хозяина [Лукаш Л. Л., 2004; Li N et al., 2015; Cao P. et al., 2018; Назаренко Ю. С. и соавт., 2020; Li D. et al., 2020; Куликова С.Г. и соавт., 2021; Marty F.H. et al., 2021; Mertens M.E., Knipe D. M., 2021; Сапронов И. С., 2022]. Цитогенетическая нестабильность клеток при бактериальных инфекциях индуцируется многими экзо- и эндогенными факторами. При развитии инфекционно-зависимого воспаления в организме повышение интенсивности мутагенных процессов может быть обусловлено как самим возбудителем (патоген-ассоциированные белковые паттерны, экзо- и эндотоксины), так и эффекторными молекулами, нарабатываемыми клетками в процессе реализации иммунного ответа и воспаления (активные формы кислорода, оксид азота, липо- и гидроперекиси, ферменты, неферментные катионные белки и др.) [Молочный В. П., 2013; Maeda H., 2013; Пожилова Е. В., 2015; Мининкова Н. С. и соавт., 2017; Амплеева Н. П. и соавт., 2019]. Еще в 70-е годы прошлого века в экспериментальной модели на животных было впервые установлено, что иммуновоспалительная реакция, развивающаяся при анафилактическом шоке, а также при реакции отторжения трансплантанта, сопровождается существенным увеличением в костном мозге и региональных лимфатических узлах числа клеток с перестройками хромосом [Скорова С. В, 1982; Лада А. Г. и соавт., 2007]. Позднее было показано, что повышение синтеза реактивных метаболитов кислорода и азота в ответ на взаимодействие бактериального липополисахарида с рецепторами TLR4 на макрофагах коррелирует с высокой активностью индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS), уровнем продукции провоспалительных цитокинов, а также с увеличением числа клеток с микроядрами при инфекционно-зависимом воспалении [Ефремова А. В. и соавт., 2010; Su T. et al., 2019; Sierra J. C. et al., 2020].

Среди большого числа бактериальных токсинов к настоящему времени известны только три генотоксина, напрямую влияющие на целостность ДНК в клетках-мишенях организма-хозяина. К ним относятся тифозный токсин, цитолетальный растягивающий токсин (CDT, от англ. Cytolethal Distending Toxin), производимый рядом грамотрицательных бактерий (*Escherichia coli, Shigella dysenteriae, Helicobacter spp.* и др.), а также колибактин, продуцируемый штаммами *Escherichia coli*, принадлежащими к филогенетической группе B2 [Дружинин В. Г. и соавт., 2018].

При этом известен достаточно широкий спектр других инфекций, при которых регистрируется высокая активность мутагенных процессов в клетках млекопитающих и человека. Например, в ряде исследований было показано значительное повышение частоты хроматидных и хромосомных аберраций в лимфоцитах периферической крови у больных микобактериальными инфекциями – лепрой и активным туберкулёзом [Gandhi G., Singh B., 2004; Ильинских Н. Н., 2005].

При инфицировании культур эндотелиоцитов человека микоплазмами (*Mycoplasma fermentas, M. hominis* и др. виды) и уреаплазмами (*Ureaplasma urealyticum*) было установлено существенное повышение частоты структурных нарушений хромосом, главным образом, за счёт появления хроматидных разрывов, а также повышение числа гипоплоидных и полиплоидных клеток [Zhang S. et al., 2004; Раковская И.В., 2005]. Микоплазмы также индуцировали явление эндоредупликации ДНК, вызывали фрагментацию хромосом, реципрокные и нереципрокные транслокации, а также появление новых, несвойственных исходному кариотипу вариантов «маркерных» хромосом. При этом выраженность мутагенного эффекта зависела от длительности контаминации, вида микоплазм и свойств клеточных культур [Раковская И. В., 2005; Морозкин Е. С. и соавт., 2009].

Обнаружено, что бактерии *Streptococcus pneumonia* обладают способностью продуцировать пероксид водорода, вследствие чего повышается частота повреждений ДНК клеток человека, опосредованных реакциями окислительного стресса [Gonzales J. et al., 2021; Mraheil M. A. et al., 2021]. Так, добавление живых

стрептококков (*S. pyogenes*) или стрептолизина-О в культуры лимфоцитов здоровых добровольцев приводило к появлению клеток с кариолизисом, кариопикнозом и хроматидными аберрациями. В культуре лимфоцитов были зарегистрированы клетки с патологическими митозами в виде хроматидных мостов и отставания хромосом (в метафазе и анафазе) [Ильинских Н. Н., 2005]. В острый период стрептококковой инфекции у пациентов было зарегистрировано достоверное повышение в крови количества эритроцитов с микроядрами, лимфоцитов со структурными аберрациями хромосом, а также полиплоидных лимфоцитов [Ильинских Н. Н., 2005; Кравченко И. Э., 2011].

Выраженным генотоксическим действием обладают грамотрицательные бактерии семейства Enterobacteriaceae [Lai Y. R. et al., 2021; Strakova N. et al., 2021]. В экспериментах на мышах было установлено существенное повышение числа клеток с хромосомными аберрациями и микроядрами в костном мозге после введения животным культур живых или убитых нагреванием *Klebsiella pneumoniae, Salmonella typhi* и *Escherichia coli*. При этом частота регистрации метафазных пластинок с цитогенетическими нарушениями коррелировала с дозой введённых бактерий [Manna G. K., Sadhukhan A., 1990].

Значительное увеличение числа лимфоцитов с хромосомными аберрациями было обнаружено в крови больных брюшным тифом и шигеллезом [Фролов А. К., 1996; Ильинских Н. Н., 2005].

Китаевой Л. В. (2010) было обнаружено достоверное повышение числа клеток с микроядрами в слизистой оболочке фундального отдела желудка у пациентов с *H. pylori*-ассоциированным хроническим гастритом по сравнению с параметрами у неинфицированных пациентов [Китаева Л. В., 2010]. При экспериментальном заражении *H. pylori* в эпителиальных клетках желудка у трансгенных Big Blue мышей происходило угнетение процессов «мисмэтч» и эксцизионной репарации ДНК, что сопровождалось увеличением частоты двунитевых разрывов, фрагментации ДНК, и в целом, повышением количества клеток с мутациями [Mommersteeg M. C. et al., 2018; Wang J. et al., 2019; Raza Y. et al., 2020; Imai S. et al., 2021; Kolinjivadi A. M. et al., 2022; Murata-Kamiya N.,

Hatakeyama M., 2022].

Как уже отмечено выше, цитолетальные токсины (CDT) различных патогенных и условно-патогенных грамотрицательных бактерий, а также колибактин, который продуцируется штаммами *E. coli*, считаются первыми бактериальными токсинами, для которых были доказаны генотоксические свойства [Li Z. R. et al., 2019; Martin O. C. B., Frisan T., 2020; Lai Y. R. et al., 2021]. Было установлено, что CDT состоит из трёх субъединиц, две из которых – CdtA и CdtC – связываются с плазматической мембраной клетки-мишени, а белок CdtB, аналогичный по строению и свойствам ДНКазе I млекопитающих, проникает внутрь ядра клетки, где вызывает повреждение ДНК, блокировку клеточного цикла и индукцию апоптоза [Chen H. P. et al., 2017; Li G. et al., 2017; Silbergleit M. et al., 2020; Kailoo S. et al., 2021]. CDT и колибактин грамотрицательных бактерий могут индуцировать в клетках двунитевые разрывы ДНК, экспрессию генов p53 и ингибитора циклин-зависимой киназы p21, фосфорилирование гистона H2AX, задержку клеточного цикла с признаками незавершенной репарации ДНК, приводящей к формированию хромосомных мостов в анафазе и к хромосомным аберрациям [Sato T. et al., 2002; Kawanishi M. et al., 2019; Shenker B. J. et al., 2020]. Было доказано, что в пролиферирующих энтероцитах, подвергнутых воздействию колибактина, длительно сохраняются микроядра, анеуплоидия, кольцевые хромосомы и хромосомные мосты в анафазе [Kawanishi M. et al., 2019]. Индуцированная CDT и колибактином геномная нестабильность может быть ассоциирована с нарушением ответа клетки на повреждение ДНК, а также с отсутствием эффективного контроля сверочных точек клеточного цикла [Martin O. C. B., et al., 2019].

Чрезмерная продукция свободных радикалов может приводить к смещению в балансе между оксидантами и антиоксидантами, вызвать нитрозативный и окислительный стресс, который играет значительную роль в повреждении биомолекул, таких как ДНК, РНК, липиды и белки, индуцируя мутации, геномную нестабильность, эпигенетические изменения, дисфункцию белков и апоптоз клеток [Murata M. et al., 2012]. Острый и хронический воспалительный процесс при

различных инфекционных заболеваниях сопровождается повышением активности окислительных ферментов, таких как iNOS, НАДФ-оксидаза и миелопероксидаза, что приводит к продукции в высоких концентрациях взаимодействующих с ДНК реактивных соединений кислорода и азота и способствует образованию в клетках 8-оксо-7,8-дигидро-2'-дезоксигуанозина и 8-нитрогуанина [Murata M. et al., 2012; Молочный В. П., 2013; Maeda H., 2013; Пожилова Е. В., 2015; Мининкова Н.С. и соавт., 2017; Амплеева Н.П. и соавт., 2019]. Являясь маркером окислительного повреждения ДНК, 8-оксо-7,8-дигидро-2'-дезоксигуанозин обладает потенциально мутагенным действием и приводит к трансверсии пары G : C (Гуанин : Цитозин) на T : A (Тимин : Аденин) или к G → T трансверсии в ходе репликации ДНК [Bruner S. D. et al., 2000].

Индикатор нитрозативного повреждения ДНК – 8-нитрогуанин –вызывает спонтанную депуринизацию нуклеотидов, формирование апуриновых сайтов, G → T трансверсий, что приводит к ошибкам ДНК полимераз и накоплению точковых мутаций [Гюлазян Н. М. и соавт., 2007; Murata M. et al., 2012]. Так, в эксперименте было показано, что у трансгенных SJL мышей существенно повышается частота мутаций гена *lacZ* в клетках органа-мишени, где была предварительно индуцирована повышенная продукция NO [Gal A., Wogan G. N., 1996]. Методами иммуногистохимии установлено, что в очагах воспаления повышенная секреция макрофагами NO сопровождается появлением признаков апоптоза и накоплением активного метаболита NO – нитротирозина в близлежащих окружающих клетках [Gal A., Wogan G. N., 1996].

Известно, что реактивные метаболиты кислорода, в том числе пероксид водорода, супероксид анион-радикал (O_2^-) и гидроксильный радикал (OH^-) не только повреждают ДНК, но и ингибируют репликацию ДНК и часто индуцируют апоптоз [Luczaj W., Skrzydlewska E., 2003; Kulbacka J. et al., 2009]. Индуцированное свободными радикалами повреждение ДНК приводит к накоплению в клетках супрессорного белка p53, обладающего проапоптотическим действием и вызывающего остановку клеточного цикла на стадии G_1 [Внуков В. В. и соавт., 2018; Korotkyi O. et al., 2020]. Помимо этого, возможен и другой механизм гибели

клеток, в котором NO-опосредованные геномные повреждения запускают повышенную экспрессию ядерного энзима поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP), что приводит к быстрому истощению его субстрата – НАД$^+$, а, следовательно, к подавлению синтеза АТФ, нарушению функционирования клетки и её гибели [Zhang J. et al., 1994; Lucarini L. et al., 2014]. Установлено также, что повышение числа разрывов ДНК и последующая активация PARP происходит в культуре макрофагов, подвергнутых воздействию липополисахарида или IFN-γ [Lucarini L. et al., 2014; Islam B. U. et al., 2015], а также в культурах клеток [Lyu M. A., Rosenblum M. G., 2005; Pacher P., Szabo S., 2008], стимулированных TNF-α. Доказано, что провоспалительные цитокины (IFN-γ, IL-1β, TNF-α) в очагах воспаления хронического характера и в опухолевой ткани, где не только активируют iNOS и последующий синтез реактивных метаболитов кислорода и азота, но и вызывают ингибирование ДНК-репарации, что способствует аккумуляции повреждений ДНК [Islam B. U. et al., 2017; Henning R. J. et al., 2018; Holotiuk V. V. et al., 2019].

Диплоидное состояние соматических клеток млекопитающих поддерживается важным контролирующим механизмом с участием субъединиц белков-циклинов (Cyc) и комплекс циклин-зависимых киназ (Cdk), функционирующего активно в течение всего клеточного цикла, что предотвращает появление и/или пролиферацию клеток с повреждённой ДНК [Sack L. M. et al., 2018; Bianchi J. J. et al., 2020]. Инициация репликации ДНК контролируется системой, предотвращающей повторную дупликацию ДНК в двух типах сверочных точек: в сверочной точке повреждения ДНК (в G_1/S точке) и в сверочной точке сборки веретена деления клетки (в М-точке), где определяется целостность диплоидного генома или правильность расхождения вновь образованных сестринских хроматид [Sack L. M. et al., 2018; Bianchi J. J. et al., 2020]. Киназа ATM (ataxia telangiectasia mutated), с мутацией гена которой связан наследственный синдром атаксии-телеангиэктазии, а также киназа ATR (ATM и Rad3-related) могут инициировать активацию сверочной точки повреждения ДНК (G_1/S точки) [Cuella-Martin R. et al., 2021]. ATM киназы активируются при двуцепочечных разрывах

ДНК, тогда как ATR киназы отвечают на патологические однонитевые повреждения. ATM и ATR киназы фосфорилируют и активируют другие эффекторные киназы Chk_2 и Chk_1 (от англ. checkpoint kinase 2 и 1), которые, в свою очередь, фосфорилируют белки, вызывающие арест клеточного цикла за счет инактивации Cdc25A фосфорилазы, которая необходима для активации циклин-зависимой киназы Cdk_2/CycE, а также стимулируют p53 путь, инициирующий старение и апоптоз дефектной клетки в G_1/S-фазах [Cuella-Martin R. et al., 2021]. В G_2-фазе дефекты реплицированной ДНК и хромосомы с разрывами активируют G_2/M сверочную точку. В результате чего ATM и/или ATR-зависимые сигнальные пути задерживают вхождение такой клетки в митоз, инактивируя Cdc25C фосфорилазу, которая необходима для активации, циклин-зависимой киназы Cdk_1/CycB. Таким образом, для защиты генома от повреждений ДНК, которые были индуцированы экзогенными и эндогенными факторами, клетки часто активируют целый каскад механизмов, направленный на контроль в определенных (сверочных) точках клеточного цикла и последующую репарацию ДНК, что должно минимизировать вероятность возникновения нестабильности генома иммунокомпетентных клеток при инфекциях [Kailoo S. et al., 2021].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Общая характеристика обследованных пациентов

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±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±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. Забор крови производили утром натощак, из кубитальной вены в объеме 20 мл. 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±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±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. 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.) и проводилось в соответствии со стандартами Хельсинской декларации Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием людей в качестве субъектов исследования» (2000 г.) и «Правилами клинической практики в Российской Федерации» (Приказ Минздрава РФ № 266 от 19.06.2003 г).

2.2 Методы исследования

Все исследования были проведены на культуре мононуклеарных лейкоцитов, выделенных из венозной крови (Таблица 1).

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

Методы исследования		Количество обследованных лиц			
		Больные с ОИКБ	Реконва-лесценты	Больные с ХИКБ	Здоровые лица
Оценка цитокинпродуцирующей активности мононуклеарных лейкоцитов при культивировании *in vitro*		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

Примечание – здесь и далее в таблицах: РБТЛ – реакция бластной трансформации лимфоцитов; БАГ – боррелиозный антиген; ФГА – фитогемагглютинин; ОИКБ – острый иксодовый клещевой боррелиоз; ХИКБ – хронический иксодовый клещевой боррелиоз

В качестве индукторов для анализа пролиферативной, цитокинсекреторной и апоптотической активности клеток в культуре *in vitro* использовали классический митоген ФГА («ПанЭко», Россия), а также 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). Боррелии предварительно культивировали в среде Barbour-Stoenner-Kelly-H (BSK H, Sigma, США) при 32°С, а затем инактивировали нагреванием при 60°С в течение 40 мин. Конечную концентрацию инактивированных боррелий (корпускулярный боррелиозный антиген (БАГ)) для внесения в клеточные суспензии мононуклеарных лейкоцитов и время культивирования подбирали экспериментальным путём в реакции РБТЛ (п. 2.2.2) на культуре клеток здоровых лиц, смешивая клетки с суспензией инактивированных боррелий в соотношениях 1:5, 1:10, 1:20 и 1:50 в соответствии с методикой, описанной в работе J. Sjöwall [Sjöwall J. et al., 2005]. В результате анализа интенсивности пролиферативного ответа лимфоцитов была определена оптимальная концентрация микробных клеток, которая составила 2×10^7 спирохет на 1 мл суспензии, содержащей 2×10^6 лейкоцитов, а также продолжительность культивирования лейкоцитов в присутствии БАГ – 120 часов.

2.2.1 Оценка цитокинпродуцирующей активности мононуклеарных лейкоцитов при культивировании *in vitro*

Венозную кровь для постановки культуральных методов забирали в пробирку с антикоагулянтом (лития гепарин). Цитокинпродуцирующую способность мононуклеарных лейкоцитов оценивали в суточных первичных клеточных культурах. Клетки выделяли путём градиентного центрифугирования цельной гепаринизированной крови на градиенте плотности Ficoll-Paque плотностью 1,077 г/см^3 («Pharmacia», Швеция). Выделенные лейкоциты дважды отмывали и 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 (ЭТС). Конечная концентрация мононуклеарных лейкоцитов в культуральных флаконах составила 2×10^6 клеток/мл. В качестве индукторов

цитокинсекреторной активности в пробы вносили корпускулярный боррелиозный антиген (БАГ) в конечной концентрации 2×10^7 спирохет/мл или ФГА в конечной концентрации 10 мкг/мл.

Флаконы инкубировали при 37°С в присутствии 5% CO_2 в течение 24 часов. После инкубации содержимое флаконов ресуспендировали, центрифугировали, в супернатантах определяли концентрацию IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF-α методом твердофазного ИФА в соответствии с инструкциями, предлагаемыми производителями тест-систем (ООО «Протеиновый контур» (Россия) и «Invitrogen Co» (США)). Оптическую плотность в лунках планшета регистрировали с помощью фотометра «Униплан» (ЗАО «Пикон», Россия) при длине волны 450 нм. Концентрацию цитокинов вычисляли по калибровочной кривой и выражали в пг/мл.

2.2.2 Анализ пролиферативной активности лимфоцитов в реакции бластной трансформации

Спонтанную и стимулированную пролиферативную активность лимфоцитов крови исследовали в реакции бластной трансформации в модифицированной клеточной культуре. Выделенные на градиенте плотности мононуклеарные лейкоциты (п. 2.2.1) культивировали в стерильных флаконах в полной питательной среде RPMI-1640 с L-глутамином с добавлением антибиотиков (100 мкг/мл стрептомицина и 100 МЕ/мл пенициллина) и 10% ЭТС. В качестве индукторов пролиферации в пробы вносили БАГ в конечной концентрации 2×10^7 спирохет/мл или ФГА в конечной концентрации 10 мкг/мл. Флаконы, периодически встряхивая, инкубировали при 37°С в присутствии 5% CO_2 в течение 72 часов (для интактной пробы и пробы с добавлением ФГА) или в течение 120 часов (для интактной пробы и для пробы с добавлением БАГ).

После окончания культивирования пробы центрифугировали, из клеточного осадка готовили мазки, которые фиксировали в этаноле и окрашивали азур II-эозином по методу Романовского-Гимзы. Интенсивность РБТЛ определяли

стандартным морфологическим методом в процессе световой микроскопии, анализируя не менее 500 клеток в каждом препарате и определяя долю (%) бласттрансформированных лимфоцитов [Гольдберг Е. Д., 1992].

2.2.3 Анализ кариопатологических изменений в лимфоцитах, выявление патологических форм митоза

Использовали препараты клеток, подготовленные для анализа РБТЛ в ФГА-модифицированных культурах. В процессе световой микроскопии определяли частоту встречаемости различных типов митозов (нормальных и патологических) на 500 клеток согласно классификации И.А. Алова (1972). В этих же препаратах анализировали спектр кариопатологических изменений, а именно, появление бинуклеаров, клеток с микроядрами, клеток с деформацией ядер [Ильинских Н. Н., 2005]. Результаты выражали в % (относительное количество патологически изменённых клеток).

2.2.4 Хромосомный анализ лимфоцитов

Для цитогенетического анализа выделенные на градиенте плотности мононуклеарные лейкоциты (п. 2.2.1) культивировали в стерильных флаконах в полной питательной среде RPMI-1640 с L-глутамином с добавлением антибиотиков (100 мкг/мл стрептомицина и 100 МЕ/мл пенициллина), 10% ЭТС и 10 мкг/мл ФГА при 37°С в присутствии 5% CO_2 в течение 52 часов. За 2 ч до фиксации клеток в культуры добавляли колхицин («Sigma», США) в конечной концентрации 0,5 мкг/мл. После инкубации с колхицином пробы центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин, супернатант отделяли, осадок ресуспендировали в свежей подогретой до 37°С среде RPMI-1640. После повторного центрифугирования проводили гипотоническую обработку клеток, добавляя к осадку 0,55% раствор хлорида калия, подогретого до 37°С; флаконы встряхивали и инкубировали при 37°С в течение 15 мин. По окончании процесса

гипотонизации пробирки снова центрифугировали, супернатант удаляли. Далее фиксировали клетки в трёх сменах охлаждённого свежеприготовленного фиксатора: 3 части этанола и 1 часть ледяной уксусной кислоты. Перед приготовлением препаратов осадок клеток ресуспендировали в 0,5 мл последней смены фиксатора, раскапывали на предварительно охлаждённые предметные стёкла и высушивали. Препараты окрашивали азур II-эозином, приготовленном на фосфатном буфере (pH 6,8), 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. Отбор метафазных пластинок осуществляли с учётом следующих требований: целостность метафазной пластинки, чёткость окраски, отсутствие или небольшое количество поперечных наложений хромосом, средняя степень их конденсации. При изучении характера структурных аберраций хромосом учитывали хроматидные и хромосомные разрывы, одиночные и парные фрагменты, обмены, центрические кольца, дицентрики и другие ассиметричные транслокации [Бочков Н. П. и соавт., 1968].

Наряду с рутинной окраской препаратов метафазных хромосом использовали методы дифференциальной окраски. Для дифференциального окрашивания хромосом использовали технику G-бэндов [Seabright M. A, 1971]. Препараты, подготовленные вышеописанным способом, после фиксации помещали в 0,025% раствор трипсина при комнатной температуре на 10-15 секунд, 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 С-метод окраски,

предусматривающий обработку препаратов 5% (насыщенным) раствором гидроксида бария, инкубацию в сбалансированном буферном растворе (2×SSC — solution of sodium chloride and sodium citrate) при 60°C, высушивание и кратковременную (2-5 мин) окраску раствором азур II-эозина [Summer A. T. et al., 1971].

2.2.5 Определение количества клеток в разных фазах клеточного цикла и в состоянии апоптоза методом проточной цитометрии

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 бромдезоксиуридин (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 *in vitro*, инкорпорировавших БДУ и находящихся в состоянии апоптоза (суб-G_0/G_1-фаза), а также в других фазах клеточного цикла: предсинтетической G_0/G_1-фазе, синтетической S-фазе, предмитотической G_2/M-фазе, митотической M-фазе.

Подготовленные суспензии клеток в полной питательной среде (п. 2.2.2) инкубировали в течение 72 часов (с добавлением ФГА) либо 120 часов (с добавлением БАГ). За 12 часов до окончания времени инкубации в пробы добавляли БДУ в конечной концентрации 10 мкмоль/мл. Дальнейшая подготовка проб для анализа проводилась согласно инструкции производителя набора. Сначала меченные БДУ клетки, предварительно собранные в пробирки в концентрации $2{,}0\times10^6$ клеток на пробу, подвергали трехкратной фиксации и обработке, приводящей к повышению проницаемости клеточных мембран с

использованием буферов «BD Cytofix/Cytoperm» и «BD Cytoperm Plus». После этого суспендированные клетки в течение 1 ч при 37°С обрабатывали ДНКазой (30 мкг на пробу) для того чтобы выявить эпитопы инкорпорированного БДУ. Далее при комнатной температуре в течение 20 мин окрашивали клетки анти-БДУ-меченными флуоресцеин изотиоцианатом (ФИТЦ) антителами, предварительно разведенными в BD Perm/Wash буфере (1:50). Для выявления общего содержания клеточной ДНК использовали 7-AAD в концентрации 20 мкг на пробу. Анализ относительного количества (%) клеток, одновременно окрашенных 7-AAD (канал FL3) и анти-БДУ ФИТЦ-мечеными моноклональными антителами (канал FL1), проводили с помощью проточного цитометра «FACSCalibur» и программы «CellQuest» («Becton Dickinson», США).

2.2.6 Определение количества клеток в состоянии апоптоза по уровню фрагментации ДНК

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]. Метод основан на использовании фермента дезоксинуклеотидил трансферазы (TdT), который катализирует присоединение бром-дезоксиуридин трифосфатов (Br-dUTP) к 3′-гидроксильным группам в местах разрывов ДНК, после чего инкорпорированные Br-dUTP выявляются с помощью ФИТЦ-меченных анти-БДУ антител. Таким образом, метод позволяет идентифицировать клетки, находящиеся в состоянии апоптоза, а также отличить их от неапоптотически погибших клеток, которые не могут инкорпорировать Br-dUTP.

Подготовка проб для анализа проводилась согласно протоколу производителя набора. Подготовленные суспензии клеток в полной питательной среде (п. 2.2.2) инкубировали в течение 72 часов (с добавлением ФГА) либо 120

часов (с добавлением БАГ). После инкубации пробы ресуспендировали и фиксировали на льду 1% параформальдегидом в течение 50 мин, после чего обрабатывали охлажденным 70% этанолом и замораживали при -20°С в течение 10 дней. Оттаявшие клетки, а также клетки положительного и отрицательного контрольных образцов (поставляются вместе с набором) ресуспендировали, промывали в BD Wash буфере и обрабатывали в течение 60 мин при 37°С раствором для мечения ДНК, содержащим TdT фермент (0,75 мкл на пробу) и Br-dUTP (8 мкл на пробу). Клетки повторно промывали буфером и окрашивали в темноте в течение 30 мин анти-БДУ ФИТЦ-меченными моноклональными антителами (5 мкл на анализ). Затем клетки обрабатывали пропидиум йодид/РНКаза-содержащим окрашивающим буфером (0,5 мл на пробу) для определения общего содержания ДНК. Определение относительного количества (%) клеток, одновременно окрашенных пропидиум йодидом и ФИТЦ, проводили на проточном цитометре FACSCalibur и программы CellQuest («Becton Dickinson», США).

2.2.7 Экспериментальная оценка влияния живых *B. garinii* на цитогенетический статус и апоптотическую активность лимфоцитов крови здоровых лиц в условиях *in vitro*

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* (культура предоставлена НПО «Вирион») 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 ч до окончания культивирования ФГА-стимулированных культур лейкоцитов здоровых доноров. В подготовленных пробах (в соответствии с п. 2.2.2) выявляли кариопатологические изменения в лимфоцитах и анализировали патологические

формы митоза (в соответствии с п. 2.2.3); проводили хромосомный анализ лимфоцитов (п. 2.2.4); определяли количество клеток в состоянии апоптоза по уровню фрагментации ДНК (п.2.2.6).

2.2.8 Статистические методы анализа результатов

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 парный критерий Стьюдента (в случае зависимых групп). Полученные результаты представлены как выборочное среднее арифметическое ($\bar{X}$) и ошибка среднего (m). В остальных случаях для определения статистической значимости различий между независимыми или зависимыми группами были использованы непараметрические критерии Манна-Уитни или Уилкоксона соответственно [Лакин Г. Ф., 1990; Гланц С., 1998], а результаты были представлены как медиана (Me) и [Q_1 ; Q_3], где Q_1 и Q_3 – первый и третий квартили. Для установления зависимостей между изучаемыми параметрами исследовали ранговую корреляцию Спирмена. Критический уровень значимости (*p*) при проверке статистических гипотез в исследовании принимался равным 0,05.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Анализ цитокинпродуцирующей активности мононуклеарных лейкоцитов при культивировании *in vitro*

В супернатантах 24-часовых первичных культур мононуклеарных лейкоцитов крови (интактных и индуцированных ФГА и БАГ) у больных с разными вариантами ИКБ, реконвалесцентов и здоровых лиц была определена концентрация иммуноцитокинов IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF-α. В результате было установлено статистически значимое повышение базальной концентрации IFN-γ в культуральной жидкости у всех пациентов с ИКБ по сравнению с контрольными значениями (Таблица 2).

Таблица 2 – Концентрация IFN-γ и IL-4 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови у больных ИКБ, Me [Q_1; Q_3]

Группы обследованных лиц	Условия культивирования клеток *in vitro*	IFN-γ, пг/мл		IL-4, пг/мл	
		БАГ	ФГА	БАГ	ФГА
1	2	3	4	5	6
Здоровые лица (контроль)	Без добавления индукторов	11,87 [6,90; 12,91]		2,87 [1,66; 4,19]	
	В присутствии индукторов	57,00 [32,67; 80,58] p*<0,01	515,27 [365,21; 983,08] p*<0,01	3,51 [1,61; 5,87]	16,78 [6,81; 28,05] p*<0,01
Больные с ОИКБ	Без добавления индукторов	44,73 [13,46; 67,68] p_1<0,01		3,43 [2,51; 6,09]	
	В присутствии индукторов	282,16 [138,42; 463,54] p_1<0,01 p*<0,01	1894,83 [1018,62; 3515,64] p_1<0,01 p*<0,01	5,41 [3,47; 8,33]	9,67 [5,84; 17,27] p*<0,01
Реконвалес-центы	Без добавления индукторов	18,92 [11,29; 24,65] p_2<0,01		2,62 [1,37; 4,32]	

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6
	В присутствии индукторов	81,47 [54,94; 121,89] p_2<0,01 p*<0,01	425,56 [206,81; 631,51] p_2<0,01 p*<0,01	4,59 [2,48; 7,17]	18,17 [6,39; 39,02] p_2<0,05 p*<0,01
Больные с ХИКБ	Без добавления индукторов	163,43 [110,62; 243,74] p_1<0,01; p_2<0,01		2,04 [1,43; 2,91]	
	В присутствии индукторов	446,23 [178,76; 755,71] p_1<0,01 p_2<0,01 p*<0,01	942,05 [698,40; 2493,35] p_1<0,01 p_2<0,01 p*<0,01	1,08 [0,59; 1,56] p_1<0,01 p_2<0,01	4,02 [2,79; 7,86] p_1<0,01 p_2<0,01

Примечание – Здесь и далее в таблицах: p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями в группе здоровых лиц, p_2 – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями в группе больных с ОИКБ, p* – при сравнении значений спонтанной и индуцированной наработки цитокина

При этом уровень спонтанной наработки цитокина у больных с хронической формой инфекции в 3,7 раза превышал таковой у пациентов с острым ИКБ и составил 163,43 [110,62; 243,74] пг/мл (p_2<0,01). При анализе продукции IFN-γ в индуцированных культурах мононуклеарных лейкоцитов было установлено, что концентрация цитокина в пробах с добавлением БАГ в группах больных с острым и хроническим ИКБ статистически значимо превышала таковую у здоровых доноров. Наиболее высокая концентрация IFN-γ была зарегистрирована у больных с хроническим ИКБ и составила 446,23 [178,76; 755,71] пг/мл, что в 1,6 раза оказалось выше соответствующего значения в группе пациентов с острым ИКБ (p_2<0,01). При этом уровень ФГА-индуцированной наработки IFN-γ у больных с острым ИКБ был в среднем в 2 раза выше, чем у пациентов с хроническим течением инфекции. Значения, отражающие уровень продукции цитокина в культурах мононуклеарных лейкоцитов у здоровых реконвалесцентов, как спонтанный, так и БАГ- и ФГА-индуцированный, были полностью сопоставимы с контрольными и статистически значимо от них не отличались (Таблица 2).

В результате анализа продукции IL-4 в культуре не было зарегистрировано статистически значимых изменений концентрации цитокина на базальном уровне во всех группах обследованных пациентов по сравнению с параметрами у здоровых лиц (Таблица 2). Значения БАГ- и ФГА-стимулированной продукции IL-4 в группах больных с острым ИКБ и здоровых реконвалесцентов также не отличались от контрольных. При этом у пациентов с хроническим ИКБ была зарегистрирована более низкая концентрация цитокина в пробах с БАГ и ФГА по сравнению с соответствующими показателями у здоровых доноров и больных с острым ИКБ (Таблица 2). Следует отметить, что у пациентов с хроническим ИКБ отсутствовал положительный ответ клеток на добавление в культуры ФГА, выражающийся в усилении наработки IL-4 по сравнению с базальным уровнем, в отличие от пациентов с острым ИКБ, здоровых реконвалесцентов и лиц контрольной группы. Добавление БАГ не приводило к повышению секреции IL-4 (относительно спонтанного уровня) ни в одной из обследованных групп пациентов и здоровых доноров.

Нами было установлено статистически значимое повышение базальной концентрации TNF-α в культуральной жидкости у всех больных ИКБ по сравнению с контрольными значениями – концентрация цитокина у пациентов с острым ИКБ составила 238,72 [126,80; 395,30] пг/мл (p_1<0,01), у больных с хроническим ИКБ – 319,73 [93,17; 673,42] пг/мл (p_1<0,01) (Таблица 3).

У здоровых реконвалесцентов после перенесенной острой боррелиозной инфекции уровень спонтанной наработки TNF-α клетками в культуре был сопоставим с контрольным (Таблица 3).

Обращало на себя внимание менее значимое усиление наработки TNF-α в ФГА-индуцированных культурах у пациентов с хроническим ИКБ по сравнению с показателями у больных с острой инфекцией (p_2<0,01).

При этом, однако, концентрация цитокина в пробах с ФГА у пациентов с острым и хроническим ИКБ статистически значимо превышала соответствующие

Таблица 3 – Концентрация TNF-α и IL-6 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови у больных ИКБ, Me [Q_1; Q_3]

Группы обследованных лиц	Условия культивирования клеток *in vitro*	TNF-α, пг/мл		IL-6, пг/мл	
		БАГ	ФГА	БАГ	ФГА
Здоровые лица (контроль)	Без добавления индукторов	51,92 [36,79; 91,98]		3,67 [2,14; 8,81]	
	В присутствии индукторов	352,67 [128,54; 603,79] p*<0,01	571,96 [212,24; 884,23] p*<0,01	770,35 [457,24; 976,73] p*<0,01	1052,12 [764,32; 1295,81] p*<0,01
Больные с ОИКБ	Без добавления индукторов	238,72 [126,80; 395,30] p_1<0,01		25,56 [11,26; 49,33] p_1<0,01	
	В присутствии индукторов	1380,64 [808,31; 1743,29] p_1<0,01 p*<0,01	1752,63 [945,92; 3261,36] p_1<0,01 p*<0,01	2596,95 [1003,31; 3990,54] p_1<0,01 p*<0,01	3169,53 [1486,46; 5843,14] p_1<0,01 p*<0,01
Реконвалесценты	Без добавления индукторов	73,50 [60,94; 98,49] p_2<0,01		10,75 [6,33; 21,07] p_1<0,01; p_2<0,01	
	В присутствии индукторов	556,34 [261,78; 799,78] p_2<0,01 p*<0,01	411,32 [174,62; 623,75] p_2<0,01 p*<0,01	450,65 [178,09; 1202,98] p_2<0,01 p*<0,01	799,41 [319,57; 1377,55] p_2<0,01 p*<0,01
Больные с ХИКБ	Без добавления индукторов	319,73 [93,17; 673,42] p_1<0,01		365,11 [218,18; 520,45] p_1<0,01; p_2<0,01	
	В присутствии индукторов	1718,44 [730,21; 2171,56] p_1<0,01 p*<0,01	963,10 [463,59; 1731,62] p_1<0,01 p_2<0,01 p*<0,01	2709,31 [1296,92; 3407,27] p_1<0,01 p*<0,01	3791,59 [1491,4; 6711,19] p_1<0,01 p*<0,01

контрольные значения и составила 1752,63 [945,92; 3261,36] пг/мл (p_1<0,01) и 963,10 [463,59; 1731,62] пг/мл (p_1<0,01) соответственно.

При исследовании концентрации IL-6 в супернатантах клеточных культур наиболее значимое повышение базального уровня цитокина было зарегистрировано в группе пациентов с хроническим ИКБ – соответствующее значение более чем в 100 раз превышало контрольный показатель (p_1<0,01) и в среднем в 15 раз было выше значения в группе больных с острым ИКБ. Уровни БАГ- и ФГА-стимулированной продукции IL-6 в культуре мононуклеарных лейкоцитов крови у больных с острым и хроническим ИКБ статистически значимо не отличались и в среднем в 3,2 и 3,3 раза (для БАГ- и ФГА-индукции) превышали соответствующие значения в группе здоровых доноров (Таблица 3).

У здоровых реконвалесцентов базальная концентрация TNF-α была сопоставима с контрольными значениями, а уровень IL-6 составил 10,75 [6,33; 21,07] пг/мл и в среднем в 3 раза превышал показатели в группе контроля (p_1<0,01).

3.2 Хромосомный анализ лимфоцитов, анализ кариопатологических изменений в лимфоцитах, выявление патологических форм митоза

3.2.1 Количество клеток с цитогенетическими нарушениями в ФГА-стимулированных культурах лимфоцитов периферической крови у больных с острым и хроническим ИКБ

Результаты исследования цитогенетического статуса у больных ИКБ в острый период заболевания и в период реконвалесценции, а также у пациентов с хроническим ИКБ приведены в таблице 4.

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_1<0,01) и 4,5 (p_1<0,01) раза (Таблица 4).

Таблица 4 – Относительное количество клеток с цитогенетическими нарушениями в ФГА-стимулированных культурах лимфоцитов периферической крови у больных с острым и хроническим ИКБ, $\overline{X} \pm m$

Исследуемые показатели	Здоровые лица (контроль)	Больные с ОИКБ	Реконвалес-центы	Больные с ХИКБ
Всего клеток с цитогенетическими нарушениями, %	3,10±0,18	16,22±0,51 p_1<0,01	4,03±0,22 p_1<0,01 p_2<0,01	14,09±0,45 p_1<0,01
Количество клеток со структурными нарушениями хромосом, %	1,28±0,10	7,31±0,34 p_1<0,01	1,42±0,10 p_2<0,01	6,18±0,46 p_1<0,01
Количество поврежденных хромосом в клетке, %	1,32±0,11	7,44±0,33 p_1<0,01	1,45±0,11 p_2<0,01	6,35±0,47 p_1<0,01
в том числе:				
с хроматидными разрывами, фрагментами	0,91±0,08	5,60±0,28 p_1<0,01	1,19±0,11 p_2<0,01	4,97±0,49 p_1<0,01
с хромосомными разрывами, фрагментами	0,32±0,05	1,62±0,14 p_1<0,01	0,19±0,03 p_2<0,01	1,21±0,11 p_1<0,01
с обменами	0,10±0,02	0,21±0,03 p_1<0,01	0,08±0,01 p_2<0,01	0,17±0,02 p_1<0,01
Количество клеток с измененным числом хромосом, %	1,82±0,13	8,91±0,25 p_1<0,01	2,61±0,15 p_1<0,01 p_2<0,01	7,91±0,29 p_1<0,01
в том числе:				
гипоплоидных клеток	1,32±0,10	3,90±0,24 p_1<0,01	1,71±0,12 p_1<0,05 p_2<0,01	2,74±0,26 p_1<0,01 p_2<0,05
гиперплоидных клеток	0,25±0,03	0,20±0,02	0,20±0,02	1,23±0,13 p_1<0,01 p_2<0,01
полиплоидных клеток	0,25±0,03	3,70±0,17 p_1<0,01	0,70±0,08 p_1<0,01 p_2<0,01	3,18±0,15 p_1<0,01
клеток с эндоредупликацией	—	1,11±0,05	—	0,76±0,08 p_2<0,05

При анализе спектра структурных аберраций хромосом в лимфоцитах больных с острым ИКБ было установлено шестикратное по сравнению с показателями контрольной группы повышение частоты хроматидных разрывов (5,60±0,28% против 0,91±0,08%, p_1<0,01), среди которых преобладали хроматидные делеции и одиночные фрагменты (Рисунок 1а), а также повышение в среднем в 5 раз частоты хромосомных разрывов (1,62±0,14% против 0,32±0,05%, p_1<0,01). Вместе с тем, мы не выявили в лимфоцитах более сложных хромосомных аберраций типа меж- и внутрихромосомных обменов, включая кольцевые или дицентрические хромосомы.

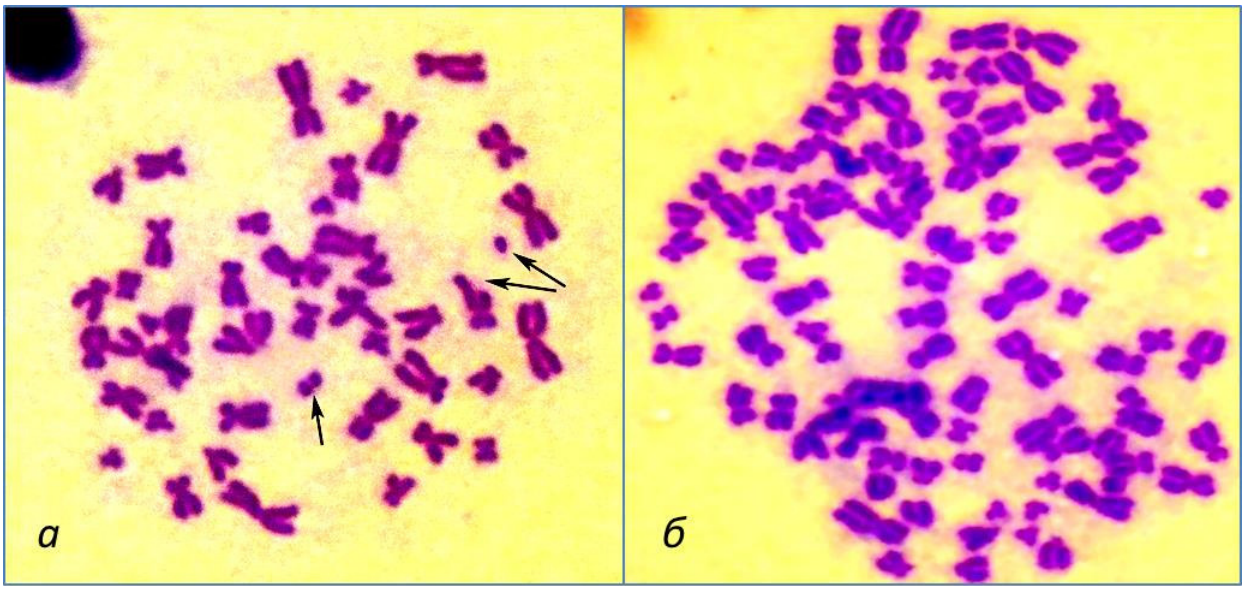

Рисунок 1 – Цитогенетические нарушения в культуре ФГА-стимулированных лимфоцитов периферической крови у больных с острым ИКБ: а – метафазная пластинка со структурными аберрациями хромосом (стрелками указаны хроматидная делеция, одиночный и парный фрагменты хромосом); б – полиплоидная клетка. Окраска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

Анализ частоты клеток с изменённым числом хромосом в наборе в культурах лимфоцитов периферической крови больных с острым ИКБ показал значительное повышение в сравнении с соответствующими контрольными значениями числа

гипоплоидных (3,90±0,24% против 1,32±0,10%, p_1<0,01) и полиплоидных (Рисунок 1б) клеток (3,70±0,17% против 0,25±0,03%, p_1<0,01), а также появление метафазных пластинок с эндоредупликацией, которые отсутствовали в культурах, полученных от реконвалесцентов и здоровых доноров (Таблица 4).

У пациентов после перенесенного острого ИКБ через 3 месяца после проведения курса антибиотикотерапии (реконвалесценты), количество клеток со структурными аберрациями хромосом существенно не отличалось от соответствующих параметров в контрольной группе (Таблица 4). Число лимфоцитов с гипоплоидией и полиплоидией было достоверно выше, чем у лиц контрольной группы, но ниже, чем в острый период заболевания, и составило соответственно 1,71±0,12% (p_1<0,05; p_2<0,01) и 0,70±0,08% (p_1<0,01; p_2<0,01).

В культурах лимфоцитов периферической крови у больных с хроническим ИКБ частота клеток со структурными аберрациями хромосом, а именно с хроматидными разрывами и фрагментами, существенно не отличалась от таковой у пациентов с острым ИКБ и сохранялась на уровне, значительно превышающем значения в контроле (4,97±0,49% против 0,91±0,08%, p_1<0,01).

Кроме этого, доля клеток с гипоплоидией (2,74±0,26%) и полиплоидией (3,18±0,15%) в культурах лимфоцитов у пациентов с хроническим ИКБ также превышала контрольные значения (1,32±0,10% (p<0,01) и 0,25±0,03% (p_1<0,01)). Частота гиперплоидных лимфоцитов у больных с хроническим ИКБ (1,23±0,13%) была значительно выше соответствующего показателя как в контрольной группе (0,25±0,03%, p_1<0,01), так и в группе больных с острым ИКБ (0,20±0,02%, p_2<0,01) (Таблица 4).

Помимо описанных выше цитогенетических нарушений, у обследованных нами пациентов с острым ИКБ были выявлены метафазные пластинки с одной или двумя гомологичными хромосомами с увеличенными прицентромерными районами (Рисунок 2, Таблица 5).

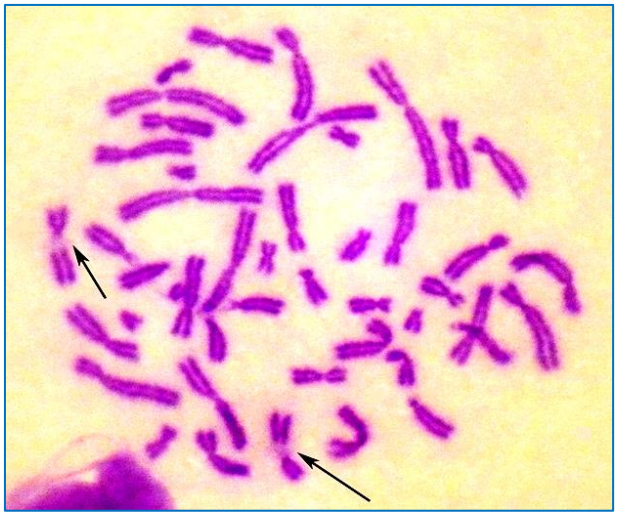

Рисунок 2 – Метафазная пластинка в культуре ФГА-стимулированных лимфоцитов периферической крови пациента с острым ИКБ. Окраска азур II-эозином по методу Романовского-Гимзы, ув.1000.

Применение дифференциальной окраски хромосом G-методом позволило идентифицировать у больных с острым ИКБ хромосому 9 с увеличенным прицентромерным районом (Рисунок 3).

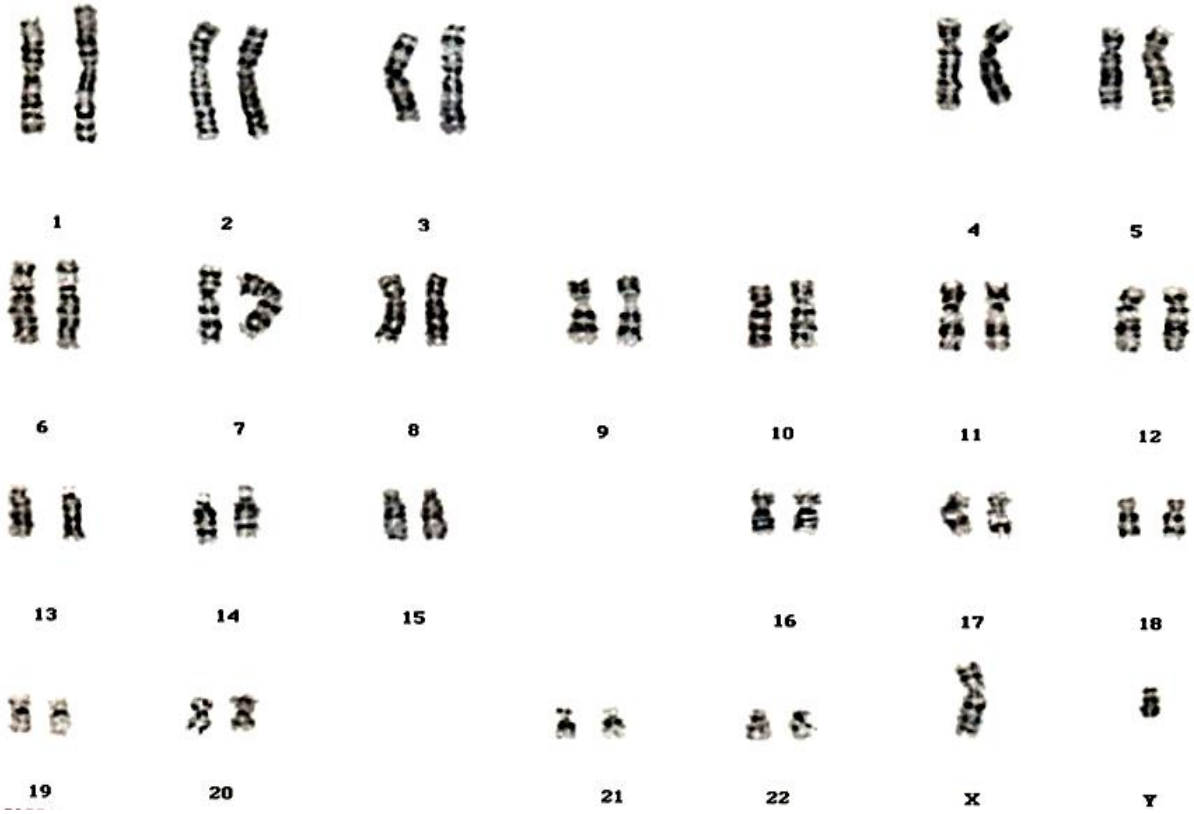

Рисунок 3 – Кариограмма пациента с острым ИКБ. Дифференциальная окраска хромосом (G-метод), ув.1000.

По результатам хромосомного анализа у всех обследованных больных с острым ИКБ было выявлено от 4 до 24 % клеток с одной (6,55±1,01 %) или даже двумя (3,75±1,51 %) гомологичными хромосомами 9 в наборе с удлинённым районом в области первичной перетяжки. При обследовании этих же пациентов через 3 месяца после выздоровления (реконвалесценты) ни у одного из них не было выявлено подобных изменений (Таблица 5). Необходимо отметить, что в лимфоцитах пациентов с хроническим ИКБ, а также у здоровых доноров хромосомы с увеличенным районом первичной перетяжки обнаружены не были (Таблица 5).

Таблица 5 – Количество лимфоцитов с полиморфизмом хромосомы 9 в культурах лимфоцитов крови у больных ИКБ (%), $\overline{X} \pm m$

Исследуемые показатели	Здоровые лица (контроль)	Больные с ОИКБ	Реконва-лесценты	Больные с ХИКБ
Количество клеток с увеличенным районом первичной перетяжки хромосомы 9, %	—	10,11±1,23	—	—
в том числе:				
в одной из гомологичных хромосом в наборе	—	6,55±1,01	—	—
в двух гомологичных хромосомах в наборе	—	3,75±1,51	—	—

В прицентромерном районе длинного плеча 9-й хромосомы располагается один из наиболее крупных гетерохроматиновых блоков, имеющий выраженный межиндивидуальный полиморфизм, который, как считалось ранее, может иметь исключительно наследственный характер, и отличается стабильностью в разных тканях индивидуума [Прокофьева-Бельговская А. А, 1986]. Блок гетерохроматина в этой области при G-окраске выявляется плохо, но может быть хорошо визуализирован с использованием С-метода. При использовании С-метода дифференциальной окраски хромосом нами не было выявлено крупных гетерохроматиновых блоков в околоцентромерном районе 9-й хромосомы в лимфоцитах у больных с острым ИКБ (Рисунок 4).

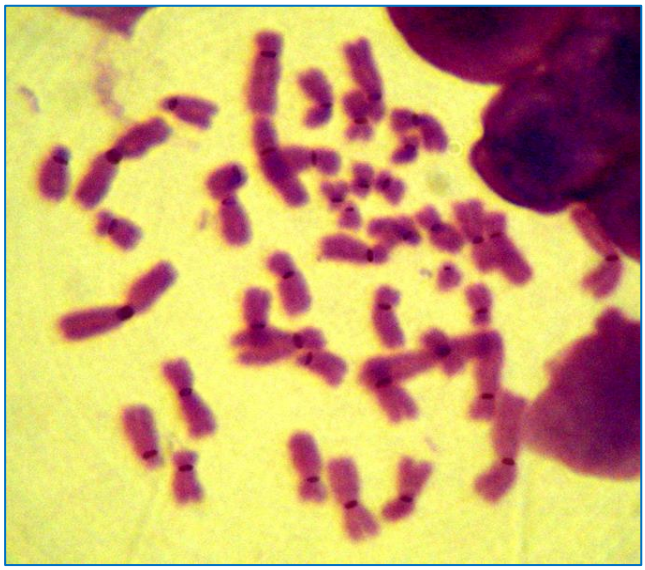

Рисунок 4 – Метафазная пластика дифференциально окрашенных хромосом (С-метод) в культуре ФГА-стимулированных лимфоцитов периферической крови пациента с острым ИКБ, ув.1000.

3.2.2 Количество клеток с цитогенетическими нарушениями в культурах лимфоцитов периферической крови здоровых лиц при добавлении живых боррелий

Данный блок исследований носил экспериментальный характер и был выполнен с целью анализа спектра цитогенетических нарушений в ФГА-стимулированной культуре лимфоцитов периферической крови, возникающих при добавлении живых *B. garinii* в условиях *in vitro*. На рисунке 5 показано, что повышение концентрации антигена приводило к достоверному увеличению числа клеток с различными типами цитогенетических нарушений, включая как хроматидные и хромосомные структурные аберрации, так и гипо- или полиплоидию.

В таблице 6 представлены результаты исследования доли хромосом со структурными аберрациями на 100 клеток, а также количества лимфоцитов с изменённым числом хромосом в наборе после добавления в культуры *B. garinii* в дозе 1:10.

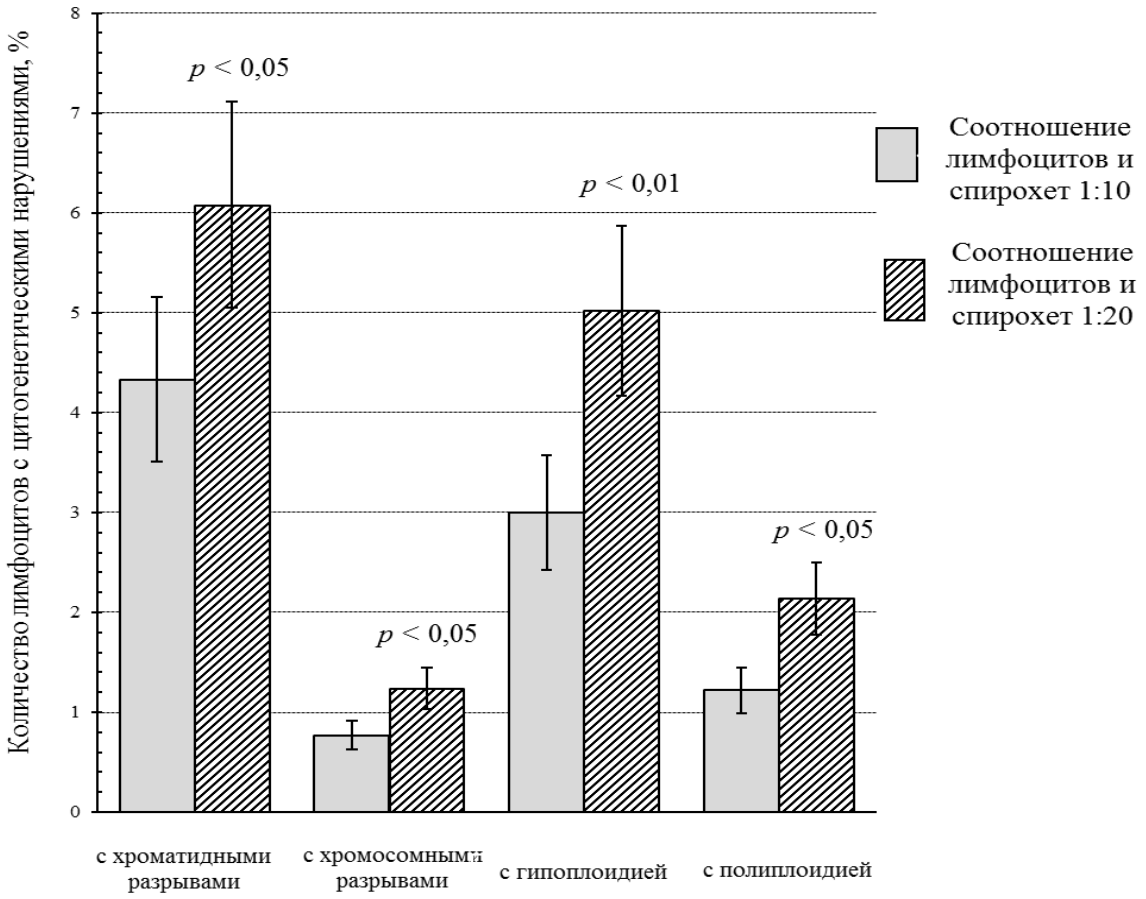

Рисунок 5 – Количество клеток с различными типами цитогенетических нарушений ($\overline{X}$ ±m) в культурах лимфоцитов при добавлении *in vitro* разных концентраций *B. garinii.* p – уровень статистической значимости межгрупповых различий.

Таблица 6 – Относительное количество клеток с цитогенетическими нарушениями в культурах лимфоцитов периферической крови здоровых лиц после добавления *B. garinii* в дозе 1:10, $\overline{X}$ ±m

Исследуемые показатели	Интактные культуры лимфоцитов	Культуры с добавлением *B. garinii* в дозе 1:10
1	**2**	**3**
Всего клеток с цитогенетическими нарушениями, %	3,10±0,18	10,87±0,59*
Количество клеток со структурными нарушениями хромосом, %	1,28±0,10	5,23±0,47*
Количество поврежденных хромосом в клетке, %	1,32±0,11	5,32±0,53*
в том числе:		
с хроматидными разрывами	0,91±0,08	4,33±0,51*
с хромосомными разрывами	0,32±0,05	0,77±0,09*

Продолжение таблицы 6

1	2	3
Количество клеток с измененным числом хромосом, %	1,82±0,13	5,55±0,52*
в том числе:		
гипоплоидных клеток	1,32±0,10	3,0±0,27*
гиперплоидных клеток	0,25±0,03	0,33±0,05
полиплоидных клеток	0,25±0,03	2,22±0,35*
Количество клеток с увеличенным районом первичной перетяжки хромосомы 9, %	—	7,44±1,10

Примечание – *p <0,001 – уровень статистической значимости межгрупповых различий.

Анализ типов цитогенетических нарушений показал, что добавление в культуры лимфоцитов крови здоровых лиц *B. garinii* способствовало повышению доли клеток с хромосомными аберрациями, спектр и степень выраженности которых были аналогичны тем изменениям, которые регистрировались у больных ИКБ в острый период инфекции (Таблица 4).

Наряду с этим в экспериментах *in vitro* при добавлении в ФГА-стимулированные культуры лимфоцитов здоровых лиц *B. garinii* в дозе 1:10 были обнаружены метафазные пластинки с аберрантной хромосомой 9, характеризующейся увеличением длины околоцентромерного района, аналогично тому, что было установлено для больных ИКБ в острый период инфекции (Таблицы 5, 6).

На основании проведённых экспериментов нами была выдвинута гипотеза о способности патогенных боррелий и их антигенов напрямую или опосредованно индуцировать повреждения хроматина, характеризующиеся, в том числе, нарушением морфологической структуры, и, вероятно, активности гетерохроматиновых участков прицентромерного района хромосомы 9.

3.2.3 Анализ кариопатологических изменений, характеристика патологических форм митоза в лимфоцитах крови у больных с острым и хроническим ИКБ

Формирование анеуплоидии и полиплоидии в культурах лимфоцитов, полученных от больных острым и хроническим ИКБ, могло быть обусловлено отставанием хромосом в делящихся клетках. При анализе атипичных форм митозов лимфоцитов в ФГА-стимулированных культурах, пациентов с острым ИКБ было выявлено существенное повышение числа клеток с отставанием хромосом в метафазе (Рисунок 6 а) (в среднем в 7,5 раза) либо в ана- и телофазе (Рисунок 6 б) (в среднем в 3,7 раза) относительно параметров у здоровых доноров (Таблица 7).

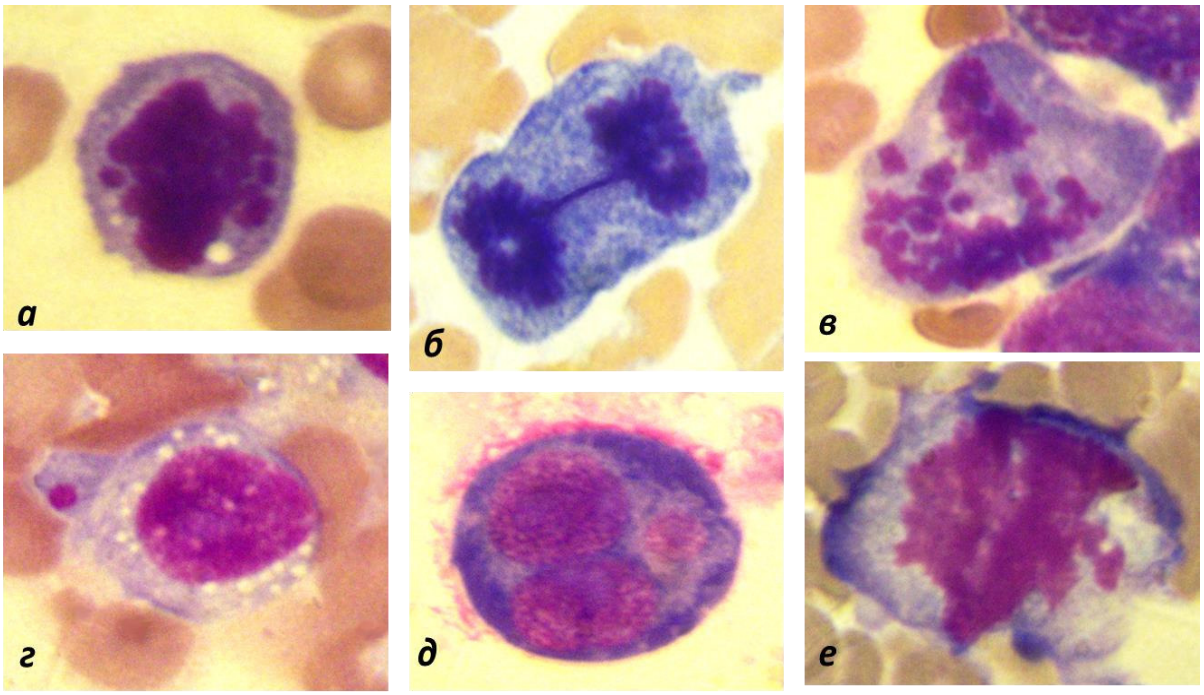

Рисунок 6 – Кариопатологические изменения и патологические формы митозов лимфоцитов у больных острым и хроническим ИКБ: а – отставание хромосом в метафазе, б – отставание хромосом в ана- и телофазе, в – многогрупповая метафаза, г – клетка с микроядром, д – бинуклеарный лимфоцит с микроядром, е – кариолизис. Окраска азур II-эозином, ув. 1000.

Наряду с этим у пациентов в острый период инфекции было зарегистрировано повышение числа клеток с многогрупповой метафазой (Рисунок 6 в) (1,04±0,11% против 0,20±0,03% в контроле, $p<0,01$) и с многополюсным митозом (0,96±0,08% против 0,22±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 (Таблица 7).

Таблица 7 – Количество клеток с кариопатологическими изменениями и патологическими митозами в ФГА-стимулированных культурах лимфоцитов периферической крови у больных с острым и хроническим ИКБ, $\bar{X} \pm m$

Исследуемые параметры	Здоровые лица (контроль)	Больные с ОИКБ	Реконва-лесценты	Больные с ХИКБ
Количество клеток с патологией митоза, %	1,13±0,11	6,10±0,46 p_1<0,01	0,79±0,09 p_1<0,05 p_2<0,01	6,07±0,41 p_1<0,01
в том числе:				
с отставанием хромосом в метафазе	0,40±0,08	2,98±0,34 p_1<0,01	0,25±0,05 p_2<0,01	3,17±0,36 p_1<0,01
с отставанием хромосом в ана- и телофазе	0,30±0,04	1,12±0,09 p_1<0,01	0,21±0,03 p_2<0,01	0,94±0,09 p_1<0,01
с многогрупповой метафазой	0,20±0,03	1,04±0,11 p_1<0,01	0,18±0,02 p_2<0,01	0,82±0,11 p_1<0,01
с многополюсным митозом	0,22±0,03	0,96±0,08 p_1<0,01	0,16±0,03 p_2<0,01	1,14±0,08 p_1<0,01
Количество клеток с кариопатологическим и изменениями, %	1,98±0,15	20,47±0,4 4 p_1<0,01	3,57±0,21 p_1<0,01 p_2<0,01	9,57±0,77 p_1<0,01 p_2<0,01
в том числе:				
с микроядрами	0,75±0,12	4,82±0,35 p_1<0,01	1,19±0,15 p_1<0,05 p_2<0,01	3,74±0,46 p_1<0,01
с кариопикнозом	0,52±0,11	6,50±0,31 p_1<0,01	1,18±0,07 p_1<0,01 p_2<0,01	0,73±0,13 p_2<0,01
с кариорексисом и/или кариолизисом	0,60±0,09	5,26±0,38 p_1<0,01	1,06±0,13 p_1<0,01 p_2<0,01	0,69±0,09 p_2<0,01
бинуклеары	0,11±0,02	3,90±0,33	0,14±0,01 p_2<0,01	4,41±0,64 p_1<0,01

Примечание – p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями в группе здоровых лиц, p_2 – по сравнению с показателями в группе больных с острым ИКБ.

При анализе кариопатологических изменений лимфоцитов у больных острым и хроническим ИКБ было обнаружено значительное увеличение в культуре клеток с микроядрами (Рисунок 6 г) по сравнению с контрольными значениями в среднем

в 6,4 (p_1<0,01) и 4,9 (p_1<0,01) раза соответственно (Таблица 7).

Наряду с этим выявлено статистически значимое увеличение числа полиплоидных и бинуклеарных лимфоцитов. В отдельных бинуклеарных клетках присутствовали и микроядра (Рисунок 6 д). Относительное количество лимфоцитов с кариопикнозом и кариорексисом (и/или кариолизисом) (Рисунок 6 е), которые являются косвенными признаками апоптоза клеток, оказалось достоверно более высоким по сравнению с контрольными значениями только у пациентов с острой формой ИКБ (6,50±0,31% и 5,26±0,38% и против 0,52±0,11% (p_1<0,01) и 0,60±0,09% (p_1<0,01) соответственно в контроле) (Таблица 7).

При этом доля клеток с подобными изменениями оставалась высокой через 3 месяца после выздоровления – в группе реконвалесцентов относительное количество лимфоцитов с кариопикнозом и с кариорексисом (и/или кариолизисом) составила (1,18±0,07% (p_1<0,01) и 1,06±0,13% (p_1<0,01) соответственно (Таблица 7).

3.2.4 Характеристика патологических форм митоза лимфоцитов у здоровых лиц при культивировании клеток *in vitro* с добавлением живых боррелий

В результате анализа различных типов патологии митоза лимфоцитов, индуцированных добавлением в ФГА-стимулированные культуры клеток здоровых лиц *B. garinii* в соотношении 1:10, было установлено существенное повышение, по сравнению с соответствующими показателями в интактном контроле, числа клеток с многогрупповой метафазой (1,91±0,18% против 0,20±0,12%, p<0,001) и многополюсным митозом (1,55±0,19% против 0,22±0,08%, p<0,001), а также относительного количества лимфоцитов с отставанием хромосом в метафазе (4,60±0,71% против 0,40±0,23%, p<0,001) или ана- и телофазе (2,83±0,38% против 0,30±0,16%, p<0,001) (Рисунок 7).

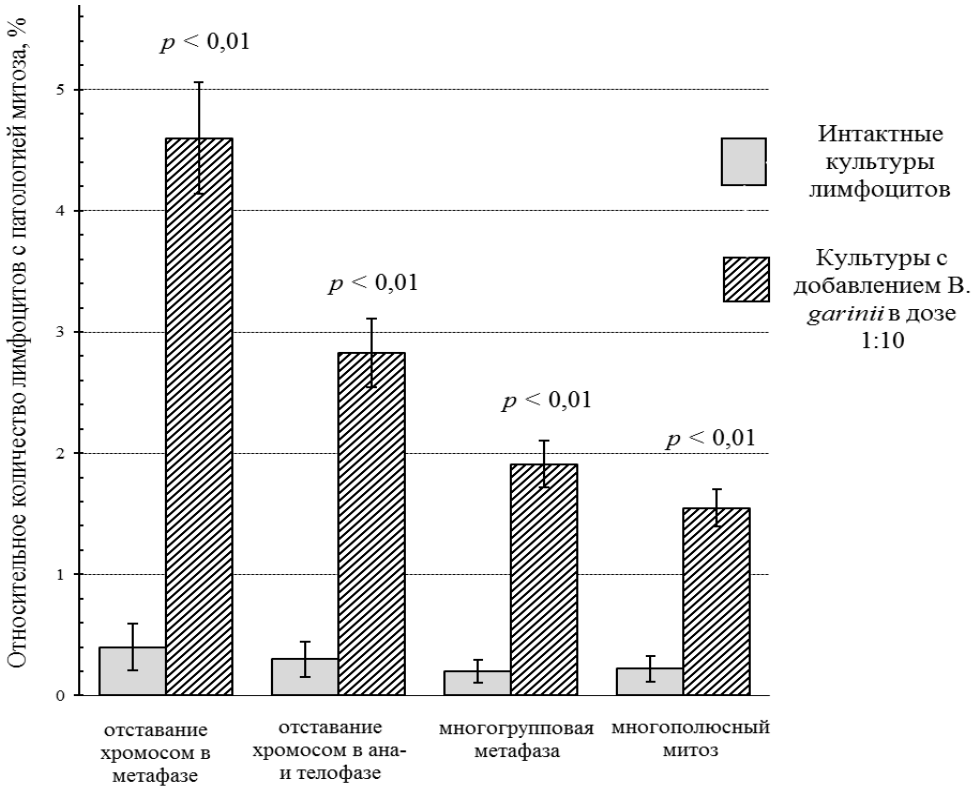

Рисунок 7 – Количество клеток с патологическими митозами в культурах лимфоцитов периферической крови у здоровых лиц при добавлении *B. garinii* ($\overline{X}$ ±m); p – уровень статистической значимости межгрупповых различий.

Таким образом, зарегистрированный спектр патологических вариантов митозов, индуцированных живыми *B. garinii* в условиях *in vitro*, аналогичен тому, который был характерен для лимфоцитов, полученных от больных с острым ИКБ.

3.3 Анализ пролиферативной активности лимфоцитов в реакции бластной трансформации в ответ на стимуляцию БАГ и ФГА у больных с острым и хроническим ИКБ

При анализе результатов РБТЛ было установлено выраженное повышение пролиферативной активности лимфоцитов в 120-часовых культурах, стимулированных БАГ, в группах пациентов, как с острым, так и с хроническим ИКБ по сравнению с соответствующими параметрами у здоровых лиц (Таблица 8).

Таблица 8 – Интенсивность РБТЛ (доля бластных форм, %) в 120-часовых интактных и БАГ-индуцированных клеточных культурах у больных с острым и хроническим ИКБ, Me [Q_1; Q_3]

Условия культивирования клеток	Здоровые лица (контроль)	Больные с ОИКБ	Реконвалесценты	Больные с ХИКБ
Без добавления индукторов	0,35 [0,25; 0,51]	1,74 [1,21; 2,70] p_1<0,001	0,87 [0,71; 1,03]	2,65 [2,15; 3,73] p_1<0,001
В присутствии БАГ	0,54 [0,41; 0,66]	15,83 [13,78; 18,52] p_1<0,001 p*<0,001	6,51 [2,49; 9,30] p_2<0,001 p*<0,001	19,11 [14,40; 24,00] p_1<0,001 p*<0,001

Примечание – Здесь и в таблицах 9, 10, 11: p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями в группе здоровых лиц, p_2 – по сравнению с показателями в группе больных с острым ИКБ, p* – при сравнении значений при различных условиях культивирования (без добавления индуктора и в присутствии БАГ)

В группе реконвалесцентов также было зарегистрировано повышенное относительно контроля количество бласт-трансформированных лимфоцитов (6,51 [2,49; 9,30] %), однако количество пролиферирующих клеток оказалось ниже значений в группах пациентов с острым и хроническим ИКБ в 2,4 раза и 2,9 раза соответственно (Таблица 8).

В результате анализа пролиферативной активности лимфоцитов в ответ на добавление ФГА были установлены более низкие значения показателя у пациентов с острым ИКБ по сравнению с параметрами у здоровых лиц, в среднем на 30% (p<0,001) (Таблица 9). При этом у больных с хроническим ИКБ также было зарегистрировано меньшее количество бластных форм лимфоцитов при культивировании клеток в присутствии ФГА, чем у здоровых доноров (в среднем в 1,3 раза, p<0,001), однако значение показателя было статистически значимо выше, чем у пациентов с острым ИКБ. Сопоставимый с параметрами у пациентов с хроническим ИКБ уровень пролиферативной активности был зарегистрирован у реконвалесцентов и составил 62,16 [45,59; 66,25] % (Таблица 9).

Таблица 9 – Интенсивность РБТЛ (количество бластных форм, %) в 72-часовых интактных и ФГА-индуцированных клеточных культурах у больных с острым и хроническим ИКБ, Me [Q_1; Q_3]

Условия культивирования клеток	Здоровые лица (контроль)	Больные с ОИКБ	Реконва-лесценты	Больные с ХИКБ
Без добавления индукторов	0,64 [0,35; 1,02]	1,92 [1,58; 2,76] p_1<0,001	1,0 [0,70; 1,28]	3,20 [2,29; 4,89] p_1<0,001
В присутствии ФГА	70,35 [58,94; 78,75] p*<0,001	38,86 [29,12; 47,71] p_1<0,001 p*<0,001	62,16 [45,59; 66,25] p_2<0,001 p*<0,001	54,78 [42,25; 59,51] p_1<0,001 p_2<0,001 p*<0,001

3.4 Результаты определения количества клеток, находящихся в разных фазах клеточного цикла и в состоянии апоптоза, методом проточной цитометрии у больных с острым и хроническим ИКБ

3.4.1 Анализ количества лимфоцитов, находящихся в разных фазах клеточного цикла при 120-часовом культивировании *in vitro* в присутствии БАГ

С помощью метода двухцветной лазерной проточной цитометрии, детектирующей флуоресцентно окрашенные клетки, инкорпорировавшие бромдезоксиуридин (БДУ), нами было установлено увеличение по сравнению с котрольными значениями числа лимфоцитов, находящихся в S-фазе клеточного цикла в интактных и БАГ-индуцированных культурах как у больных с острым ИКБ, так и у пациентов с хронической формой инфекции (Таблица 10).

Таблица 10 – Количественный состав лимфоцитов, находящихся в разных фазах клеточного цикла при 120-часовом культивировании *in vitro* в присутствии БАГ, у больных с острым и хроническим ИКБ, Me [Q_1; Q_3]

Группы обследованных лиц	Условия культивирования	Количество клеток, находящихся в разных фазах клеточного цикла, %		
		S–фаза	G_2/M–фаза	G_0/G_1–фаза
Здоровые лица (контроль)	Без добавления индуктора	1,22 [0,67; 2,33]	0,34 [0,15; 0,52]	90,10 [82,10; 95,20]
	В присутствии БАГ	1,96 [0,88; 3,31] p*<0,01	0,73 [0,49; 1,43] p*<0,01	76,34 [71,23; 83,05] p*<0,01
Больные с ОИКБ	Без добавления индуктора	3,32 [2,17; 4,66] p_1<0,05	0,98 [0,48; 1,43] p_1<0,05	79,85 [78,45; 82,63]
	В присутствии БАГ	18,50 [16,66; 19,70] p_1<0,001 p*<0,01	5,25 [3,52; 5,88] p_1<0,01 p*<0,01	53,48 [47,19; 57,77] p_1<0,001 p*<0,01
Реконвалесценты	Без добавления индуктора	0,83 [0,55; 1,59] p_2<0,01	0,18 [0,12; 0,31] p_2<0,05	83,45 [81,0; 90,10]
	В присутствии БАГ	7,28 [5,38; 10,09] p_1<0,01 p_2<0,01 p*<0,01	1,83 [1,12; 2,65] p_1<0,05 p_2<0,01 p*<0,01	71,19 [66,33; 74,09] p_2<0,01 p*<0,01
Больные с ХИКБ	Без добавления индуктора	5,78 [2,33; 6,23] p_1<0,01	1,67 [1,05; 2,38] p_1<0,01	85,40 [81,80; 88,50]
	В присутствии БАГ	28,19 [18,33; 32,93] p_1<0,001 p*<0,01	6,12 [4,35; 7,58] p_1<0,001 p*<0,01	58,12 [52,18; 61,87] p_1<0,01 p*<0,01

Относительное количество лимфоцитов в фазе G_2/M у больных с острым и хроническим ИКБ также статистически значимо превышало контрольные значения (как на базальном уровне (в интактных культурах), так и при индукции БАГ. Количество же клеток в фазе G_0/G_1 в БАГ-индуцированных культурах, напротив,

оказалось ниже, чем у здоровых доноров и составило у пациентов с острым ИКБ 53,48 [47,19; 57,77]%, у пациентов с хроническим ИКБ 58,12 [52,18; 61,87]% при 76,34 [71,23; 83,05]% в контрольной группе (p_1<0,01) (Таблица 10).

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. При этом в культурах, индуцированных БАГ, доля клеток, находящихся в S- и G_2/M-фазах клеточного цикла, хотя и превышала значения в группе контроля в 3,7 и 2,5 раза соответственно, но была существенно ниже, чем у больных в острый период заболевания: доля клеток в S-фазе составила 7,28 [5,38; 10,09]% против 18,50 [16,66; 19,70]% в острый период инфекции (p_2<0,01); доля клеток в G_2/M-фазе составила 1,83 [1,12; 2,65]% против 5,25 [3,52; 5,88]% в острый период инфекции (p_2<0,01).

Наиболее часто лимфоциты в фазах S и G_2/M встречались в БАГ-стимулированных культурах у больных с хроническим течением заболевания (Таблица 10). Наряду с этим, 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) (7,22 % [5,16; 8,61]), по сравнению с соответствующим показателем у здоровых лиц (15,24 % [12,47; 19,65], p<0,01) (Таблица 11).

Полученные результаты свидетельствует о том, что при хроническом течении боррелиозной инфекции наблюдается усиление пролиферативного ответа лимфоцитов на антигены возбудителя при одновременном подавлении апоптоза реактивных клеток, что, вероятно, лежит в основе нарушения механизмов активационно-индуцированной клеточной смерти и может способствовать гиперактивации клеточного звена иммунитета и хронизации воспаления.

Таблица 11 – Количество лимфоцитов (%), одновременно окрашенных анти-БДУ ФИТЦ-меченными моноклональными антителами и 7-AAD (свидетельствует о состоянии апоптоза – суб-G_0/G_1-фаза), в интактных и БАГ-индуцированных 120-часовых культурах, Me [Q_1; Q_3]

Условия культивирования	Здоровые лица (контроль)	Больные с ОИКБ	Реконвалесценты	Больные с ХИКБ
Без добавления индуктора	4,88 [2,56; 10,73]	12,40 [10,76; 14,95] $p_1<0,05$	7,94 [4,57; 10,99]	4,66 [3,44; 5,05]
В присутствии БАГ	15,24 [12,47; 19,65] $p^*<0,01$	22,13 [20,02; 23,71] $p_1<0,05$ $p^*<0,01$	18,05 [17,33; 19,10] $p^*<0,001$	7,22 [5,16; 8,61] $p_1<0,01$ $p_2<0,01$ $p^*<0,001$

3.4.2 Анализ количества лимфоцитов, находящихся в разных фазах клеточного цикла при 72-часовом культивировании *in vitro* в присутствии ФГА

В результате определения методом проточной цитометрии количества клеток, инкорпорировавших БДУ (Рисунок 8), у больных с острым ИКБ было установлено статистически значимое повышение по сравнению с контрольными значениями числа клеток, находящихся в S- и G_2/M-фазах клеточного цикла в интактных культурах, при их снижении в ФГА-индуцированных пробах (Таблица 12). При этом количество лимфоцитов в фазе G_0/G_1 при остром ИКБ в ФГА-стимулированных культурах оказалось выше контрольных значений, что косвенно может свидетельствовать об аресте клеточного цикла в G_1-фазе при митогенной стимуляции.

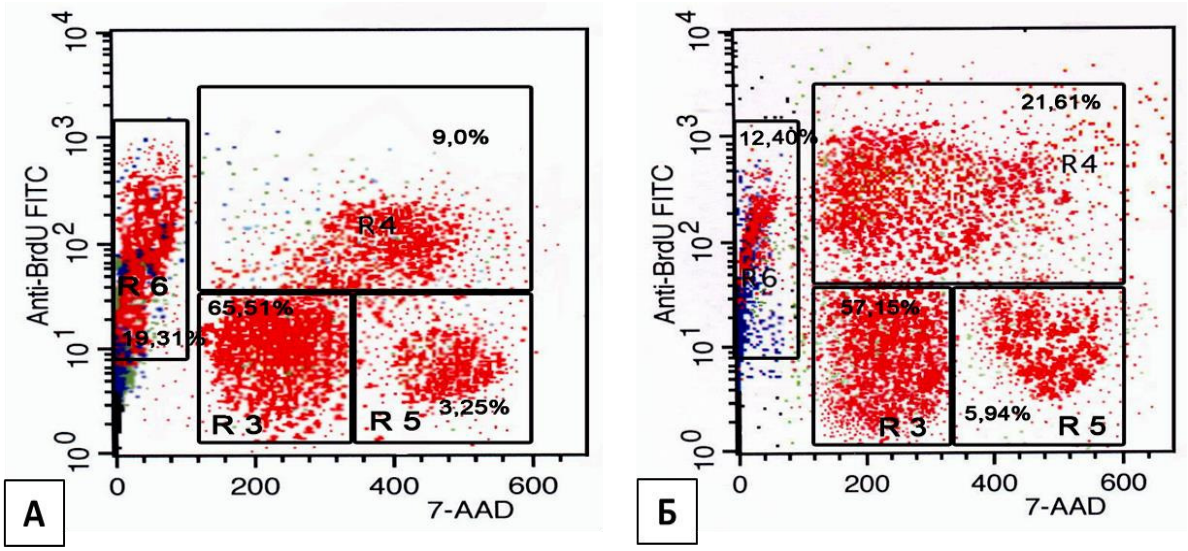

Рисунок 8 – Гейтирование популяций лимфоцитов, инкорпорировавших БДУ, находящихся в различных фазах клеточного цикла либо в состоянии апоптоза в ФГА-стимулированных культурах: А – у пациентов с острым ИКБ; Б – у здоровых доноров. Региону 3 (R3) соответствуют лимфоциты, находящиеся в G_0/G_1-фазе клеточного 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.

Таблица 12 – Количественный состав лимфоцитов, находящихся в разных фазах клеточного цикла при 72-часовом культивировании *in vitro* в присутствии ФГА, у больных с острым и хроническим ИКБ, Me [Q_1; Q_3]

Группы обследованных лиц	Условия культивирования	Количество клеток, находящихся в разных фазах клеточного цикла, %		
		S–фаза	G_2/M–фаза	G_0/G_1–фаза
1	2	3	4	5
Здоровые лица (контроль)	Без добавления индуктора	1,60 [1,03; 1,80]	0,51 [0,37; 0,76]	88,52 [86,70; 90,80]
	В присутствии ФГА	21,61 [20,34; 23,23] p*<0,01	5,94 [4,66; 6,74] p*<0,01	57,15 [56,48; 59,68] p*<0,01
Больные с ОИКБ	Без добавления индуктора	3,17 [2,79; 3,38] p_1<0,01	1,37 [1,06; 1,70] p_1<0,01	80,71 [79,78; 84,0] p_1<0,01
	В присутствии ФГА	9,01 [7,92; 9,97] p_1<0,01 p*<0,01	3,25 [2,67; 3,49] p_1<0,01 p*<0,01	65,51 [62,19; 66,20] p_1<0,01 p*<0,01

Продолжение таблицы 12

1	2	3	4	5
Реконва-лесценты	Без добавления индуктора	1,31 [0,53; 1,57] p_2<0,01	0,45 [0,43; 1,17] p_2<0,01	84,41 [81,95; 89,91]
	В присутствии ФГА	15,88 [15,0; 17,36] p_1<0,01 p_2<0,01 p*<0,01	6,86 [6,06; 7,74] p_2<0,01 p*<0,01	61,45 [57,96; 63,68] p*<0,01
Больные с ХИКБ	Без добавления индуктора	6,17 [3,68; 7,95] p_1<0,01 p_2<0,01	1,85 [1,63; 2,34] p_1<0,01	78,62 [76,82; 81,88] p_1<0,01
	В присутствии ФГА	23,74 [18,67; 26,18] p_2<0,01 p*<0,01	6,51 [6,17; 7,74] p_2<0,01 p*<0,01	56,31 [56,26; 58,39] p_2<0,01 p*<0,01

Примечание – p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями в группе здоровых лиц, p_2 – по сравнению с показателями в группе больных с острым ИКБ, p* – при сравнении значений при различных условиях культивирования (без добавления индуктора и в присутствии ФГА).

Относительное количество делящихся клеток в S- и G_2/M-фазах в ФГА-стимулированных культурах у больных с хроническим ИКБ (23,74 [18,67; 26,18] %) и 6,51 [6,17; 7,74] %) статистически значимо не отличалось от соответствующих показателей в контрольной группе (21,61 [20,34; 23,23] %) и 5,94 [4,66; 6,74] %).

В группе реконвалесцентов значения параметров, характеризующих количественный состав лимфоцитов, находящихся в разных фазах клеточного цикла в интактных культурах лимфоцитов, были сопоставимы с контрольными значениями. При этом относительное количество клеток, находящихся в S-фазе клеточного цикла в ФГА-стимулированных пробах оказалось ниже контрольных значений и составило 15,88 [15,0; 17,36] % при 21,61 [20,34; 23,23] % в контроле (p_1<0,01) (Таблица 12).

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 (Рисунок 9).

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 (Рисунок 9). 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 ($p_1 < 0,01$) (Рисунок 9).

3.4.3 Результаты определения количества клеток в состоянии апоптоза по уровню фрагментации ДНК в БАГ- и ФГА-индуцированных культурах лимфоцитов у больных с острым и хроническим ИКБ

Количественный анализ клеток, инкорпорировавших бром-дезоксиуридин трифосфаты (Br-dUTP) и одновременно окрашенных пропидиум йодидом и анти-БДУ ФИТЦ-меченными 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 (Таблица 13, Рисунок 10).

У пациентов с острым ИКБ в культурах мононуклеарных клеток, стимулированных БАГ, относительное количество апоптотически погибших клеток было статистически значимо выше, чем у здоровых доноров и больных с хроническим ИКБ (Таблица 13).

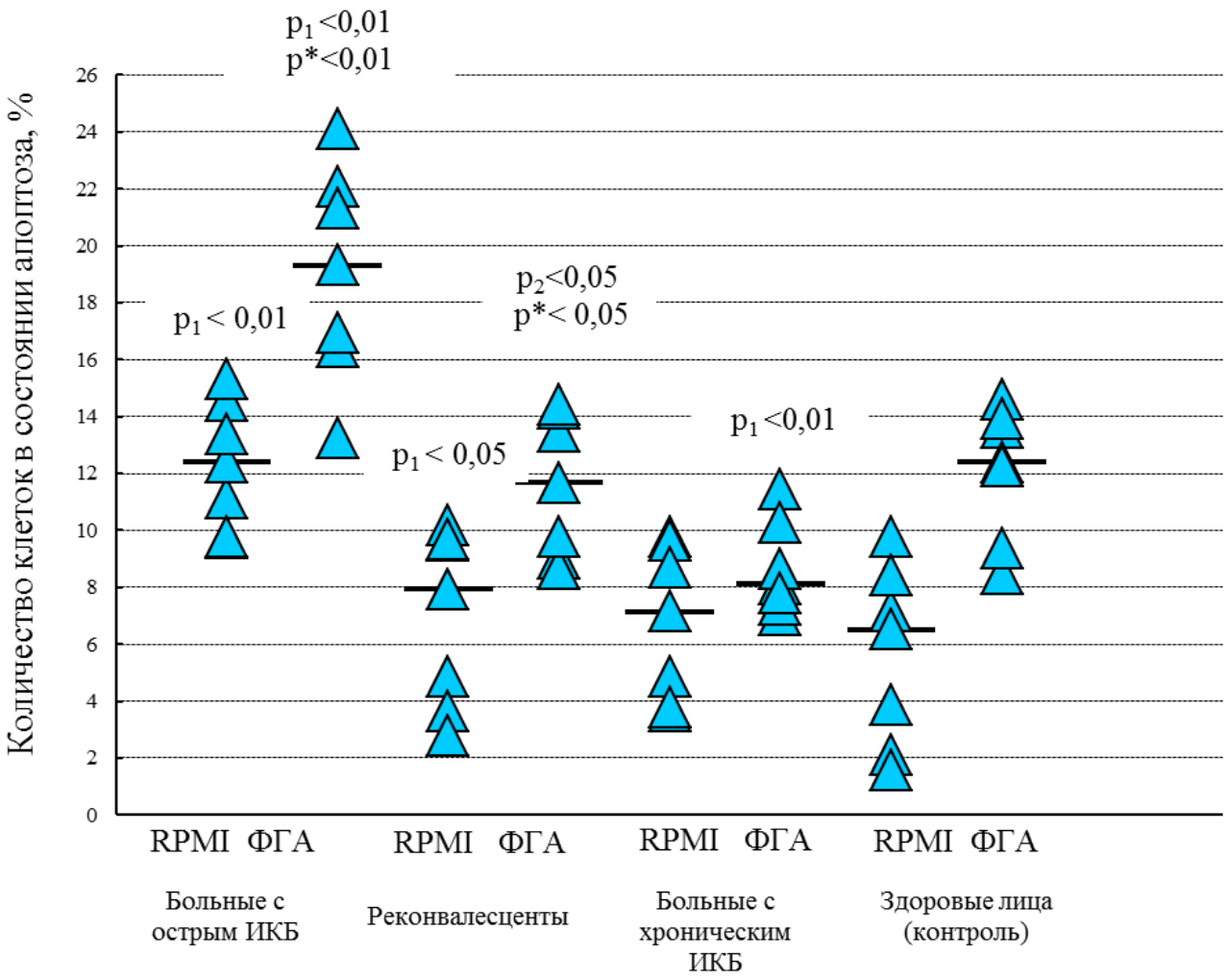

Рисунок 9 – Количество лимфоцитов, одновременно окрашенных анти-БДУ ФИТЦ-меченными моноклональными антителами и 7-AAD (что свидетельствует о состоянии апоптоза – суб-G_0/G_1-фаза) в интактных 72-часовых культурах (среда RPMI-1640) и ФГА-индуцированных культурах. Горизонтальные линии соответствуют медиане (Me). p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями в группе здоровых лиц, p_2 – по сравнению с показателями в группе больных с острым ИКБ, p* – при сравнении значений при различных условиях культивирования (без добавления индуктора и в присутствии ФГА).

Таблица 13 – Количественный состав лимфоцитов, находящихся в состоянии апоптоза либо некроза при 120-часовом культивировании *in vitro* в присутствии БАГ, у больных с острым и хроническим ИКБ, Me [Q_1; Q_3]

Анализируемые параметры	Интактный контроль	Здоровые лица (контроль)	Больные с острым ИКБ	Больные с хроническим ИКБ
1	**2**	**3**	**4**	**5**
Количество клеток, погибших путём апоптоза %	1,86 [0,56; 2,03]	13,51 [9,63; 15,67]	18,03 [15,35; 20,40] p_1<0,05	5,62 [3,54; 8,11] p_1<0,01 p_2<0,001

Продолжение таблицы 13

1	2	3	4	5
Количество клеток, погибших путём некроза, %	0,97 [0,12; 1,23]	2,18 [0,79; 2,51]	1,07 [0,53; 2,03]	1,15 [0,37; 1,81]

Примечание – Здесь и в таблице 14: p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями в группе здоровых лиц, p_2 – по сравнению с показателями в группе больных с острым ИКБ.

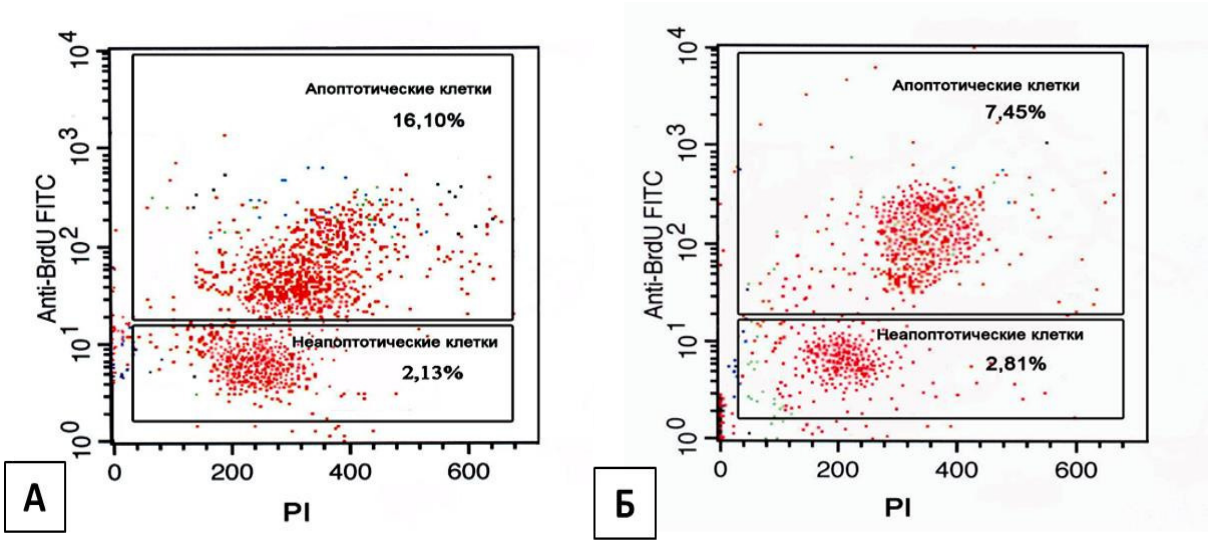

Рисунок 10 – Гейтирование лимфоцитов, окрашенных пропидиум йодидом (PI) и анти-БДУ ФИТЦ-меченными моноклональными антителами (anti-BrdU FITC), позволяющих идентифицировать количество клеток, погибших посредством апоптоза либо некроза (неапоптотические клетки) в ФГА-стимулированных культурах лимфоцитов периферической крови: А – больные с острым ИКБ; Б – здоровые лица (контроль).

Доля лимфоцитов, погибших в результате некроза, у больных ИКБ оказалась сопоставимой с контрольными значениями и не зависела от формы заболевания (острое либо хроническое).

Сходные результаты были получены и при анализе количественного состава лимфоцитов, находящихся в состоянии апоптоза либо некроза при 72-часовом культивировании *in vitro* в присутствии ФГА. Так, у больных с острым ИКБ средняя численность клеток в состоянии апоптоза превышала таковую в группах здоровых доноров и пациентов с хроническим ИКБ (Таблица 14).

Таблица 14 – Количественный состав лимфоцитов, находящихся в состоянии апоптоза либо некроза при 72-часовом культивировании *in vitro* в присутствии ФГА, у больных с острым и хроническим ИКБ, Me [Q_1; Q_3]

Анализируемые параметры	Интактный контроль	Здоровые лица (контроль)	Больные с ОИКБ	Больные с ХИКБ
Количество клеток, погибших путём апоптоза %	1,86 [0,56; 2,03]	7,45 [5,62; 9,18]	16,10 [12,31; 17,89] p_1<0,001	4,02 [1,88; 5,02] p_1<0,05 p_2<0,001
Количество клеток, погибших путём некроза, %	0,97 [0,12; 1,23]	2,81 [1,62; 4,89]	2,13 [1,56; 3,11]	2,36 [1,04; 3,47]

Следует отметить, что число клеток в состоянии апоптоза в как в БАГ- так и в ФГА-стимулированных культурах лимфоцитов крови у больных хроническим ИКБ, оказалось значительно ниже соответствующих параметров, как у здоровых лиц, так и у пациентов с острой формой ИКБ и составило 5,62 [3,54; 8,11] % (p_1<0,01; p_2<0,001) и 4,02 [1,88; 5,02] % (p_1<0,05; p_2<0,001) соответственно (Таблицы 10, 11).

3.4.4 Анализ апоптотической активности лимфоцитов здоровых лиц в культуре *in vitro* при добавлении живых боррелий

Для исследования влияния *B. garinii* на апоптотическую активность клеток в культуре лимфоцитов, полученных от здоровых доноров, вносили разные концентрации спирохет в соотношении лимфоцитов и бактериальных клеток как 1:10, 1:20 или 1:50. Было установлено, что повышение концентрации боррелий приводило к существенному росту числа апоптотически погибших клеток (Рисунок 11). Так, в пробах с концентрацией бактериальных клеток 1:10 относительное количество апоптотически погибших лимфоцитов составило 12,47 [10,29; 15,89] %,

в пробе с концентрацией 1:20 – 16,40 [10,28; 20,53] %, в пробе с концентрацией 1:50 – 27,79 [24,01 30,05] % при количестве клеток в интактных контрольных пробах 2,11 [1,98; 2,45] % (Рисунок 11).

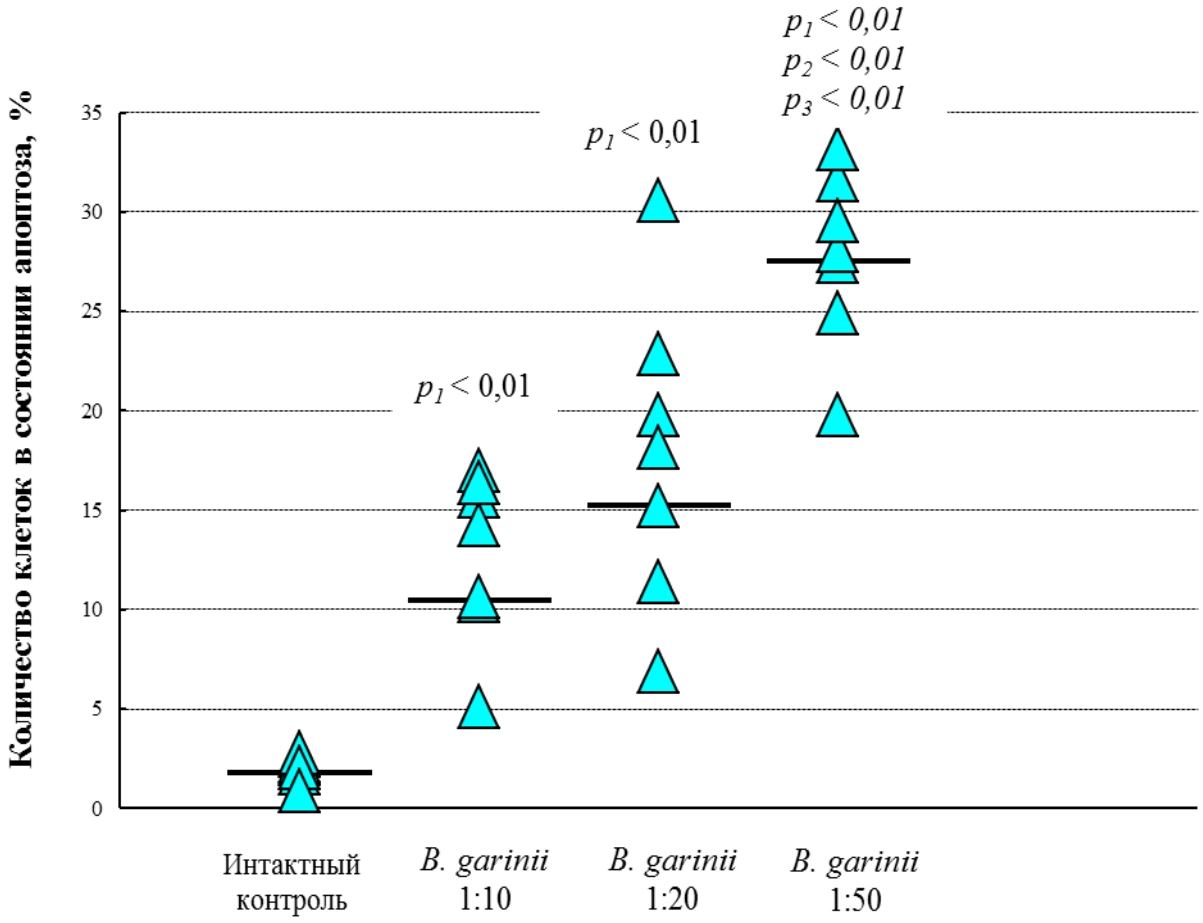

Рисунок 11 – Количество лимфоцитов, находящихся в состоянии апоптоза, иммунофлуоресцентно окрашенных пропидиум йодидом и анти-БДУ ФИТЦ-меченными моноклональными антителами, при добавлении в клеточные культуры здоровых лиц разных концентраций *B. garinii* (1:10, 1:20, 1:50). Горизонтальная линия соответствует медиане (Ме). p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с интактным контролем, p_2 – с пробой 1:10, p_3 – с пробой 1:20.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

4.1 Кариопатологические изменения и цитогенетические нарушения в лимфоцитах крови у больных ИКБ

Иксодовые клещи являются переносчиками целого ряда патогенных микроорганизмов и паразитических простейших, таких как вирусы КЭ, лихорадки Западного Нила, геморрагических лихорадок, патогенные боррелии, риккетсии, бабезии, анаплазмы, эрлихии и др. [Злобин В. И., 2015; Рудаков Н. В. и соавт., 2019; Якименко В. В., 2019]. Ряд экспериментальных и клинических исследований свидетельствуют о том, что бактерии, вирусы, простейшие способны индуцировать в клетках человека числовые и структурные хромосомные аберрации [Ильинских Н. Н. и соавт., 2005]. К настоящему времени достаточно хорошо изучено влияние ионизирующего излучения, как и эффекты химических мутагенов на клетки человека, однако мутагенные последствия инфекций являются предметом исследования лишь спорадически. По этой причине отсутствуют четкие представления о механизмах генотоксического воздействия инфекционных агентов, не изучены последствия цитогенетической нестабильности у человека, перенесшего инфекционное заболевание, что делает затруднительным какой-либо научно обоснованный медико-генетический прогноз. Кроме того, имеющиеся на сегодняшний день сведения о цитогенетических последствиях клещевых инфекций не позволяют ответить на вопрос, который возникает в процессе реабилитации больного: как быстро и в какие сроки происходит восстановление цитогенетического гомеостаза организма у человека, перенесшего острую инфекцию [Ильинских Н. Н. и соавт., 2016]

В результате проведённого нами исследования у пациентов с острым и хроническим ИКБ было зарегистрировано существенное повышение числа лимфоцитов с цитогенетическими нарушениями по сравнению с параметрами у здоровых лиц в среднем в 5,2 и 4,5 раза соответственно (Таблица 4). Большинство

регистрируемых аберраций были хроматидного типа (делеции, одиночные фрагменты) и реже встречались нарушения хромосомного типа. Полученные нами данные по некоторым показателям оказались сопоставимы с результатами ранее проведённых исследований Пироговой Н. П. с соавт. (2005), в результате которых у больных острым ИКБ также было выявлено статистически значимое повышение общего количества клеток с хромосомными аберрациями на фоне снижения активности системы репарации ДНК в лимфоцитах периферической крови [Пирогова Н. П. и соавт., 2005]. При этом авторы, наряду с парными фрагментами и разрывами хроматид, обнаружили лимфоциты с более сложными хромосомными аберрациями типа меж- и внутрихромосомных обменов, включая кольцевые или дицентрические хромосомы, которые, как правило, характерны для эффектов ионизирующего излучения [Cai T. J. et al., 2021]. Мы же не выявили в лимфоцитах подобных сложных хромосомных аберраций, однако исследование частоты клеток с изменённым числом хромосом в наборе в культурах лимфоцитов периферической крови больных с острым ИКБ показало значительное повышение в сравнении с соответствующими контрольными значениями числа гипоплоидных и полиплоидных клеток, а также появление метафазных пластинок с эндоредупликацией, которые отсутствовали в культурах у реконвалесцентов и здоровых лиц (Таблица 4). Анализируя полученные данные, можно предположить, что различия цитогенетического статуса у больных ИКБ могли быть обусловлены разностью генотоксических эффектов на клетки человека различных видов и генотипических вариантов патогенных боррелий. Так, известно, что клиническая картина ИКБ, особенности его течения и исходы в большой степени зависят от видовой принадлежности и генотипических особенностей возбудителя [Рудакова С. А. и соавт., 2021]. Например, патогномоничный признак ИКБ – мигрирующая эритема – наиболее часто наблюдается при инфицировании боррелиями видовой подгруппы *B. burgdorferi sensu lato*, в частности, *B. afzelii* (до 90% случаев), тогда как при инфицировании *B. garinii* МЭ выявляется примерно в 40% случаев, но характерным является преимущественное поражение нервной системы [Рудакова

С. А. и соавт., 2021]. Для инфекции, обусловленной *B. burgdorferi sensu stricto*, характерно поражение опорно-двигательного аппарата с длительным хроническим течением. Кроме того, имеются убедительные доказательства, что некоторые из безэритемных форм ИКБ связаны с видом *B. miyamotoi*, который генетически ближе к боррелиям группы клещевой возвратной лихорадки, но передается иксодовыми клещами [Лубова Л. В., Леонова Г. Н., 2019; Колясникова Н.М. и соавт. 2020].

При анализе результатов проведённого исследования мы впервые установили, что сходные типы нарушений в одной или двух гомологичных хромосомах являются не просто разрывами, а 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 (Таблица 5). Использование методов дифференциальной окраски хромосом позволило нам определить, что все эти нарушения локализовались в хромосоме 9 (Рисунок 3), которая у некоторых индивидов имеет наследственно-ассоциированный крупный блок гетерохроматина в перицентромерной области. Известно, что блок гетерохроматина в данной области при G-окраске визуализируется плохо, но может быть хорошо выделен с использованием С-метода. Однако применение С-метода дифференциальной окраски хромосом не позволило нам выявить наличие какого-либо крупного гетерохроматинового блока в области центромеры 9-й хромосомы в метафазных пластинках пациентов с острым ИКБ, что, предположительно, свидетельствует о том, что данный участок приобрёл свойства эухроматина. По данным литературы известно, что в прицентромерном районе длинного плеча 9-й хромосомы располагается один из крупнейших гетерохроматиновых блоков, имеющий выраженный межиндивидуальный полиморфизм, который, как полагали ранее, может иметь только наследственный характер и обладает исключительной стабильностью в разных тканях [Прокофьева-Бельговская А. А., 1986]. Было замечено, что размер перетяжек в аутосомах 1, 9 и 16 варьирует в достаточно

широких пределах. У отдельных индивидов этот район настолько велик, что при рутинной окраске может выглядеть как протяжённый истончённый проксимальный участок длинного плеча [Прокофьева-Бельговская А. А., 1986]. Установлено, что наследственно обусловленные изменения гетерохроматина перицентромерных областей хромосом встречаются довольно редко, в нормальной популяции с малой частотой (4-9 %) у отдельных индивидов в хромосомном наборе может присутствовать только одна из хромосом 1, 9 или 16 с очень крупным перицентромерным С-блоком гетерохроматина. Прицентромерный полиморфизм хромосомы 9 может заключаться не только в изменении размеров гетерохроматиновых блоков, но и в формировании перицентрических инверсий. Установлена также вероятность формирования С-негативных или G-позитивных дополнительных блоков в пределах данного участка гетерохроматина. Наличие подобного типа наследуемых изменений в перицентромерной области связывают с различного рода патологиями внутриутробного развития и формированием умственной отсталости в раннем детском возрасте [Xie X. et al., 2020]. В экспериментах на клеточных культурах было установлено, что в условиях старения в поздних пассажах культур первичных фибробластов либо в результате воздействия на клетки разноплановых стрессовых факторов (включая гипертермию, окислительный стресс, эффекты тяжёлых металлов или других химических соединений) происходит экспрессия белков теплового шока (HSP – *англ.* heat shock proteins) [Giordano M. et al., 2020; Thakur J. et al., 2021]. Они функционируют как молекулярные шапероны, моделируя сборку, транспорт и фолдинг других белков, а также занимают важное место в регуляции апоптоза иммунокомпетентных клеток [Dai C., 2018]. Современные исследования продемонстрировали, что в условиях стресса, находящийся в цитоплазме транскрипционный фактор гена теплового шока HSF1 после фосфорилирования перемещается в ядро клетки, где он взаимодействует со специфическим субклассом сателлитных последовательностей ДНК в перицентромерных районах гетерохроматина хромосомы 9 (регион 9q11–q12), 12 и 15 человека, что

сопровождается транскрипционной активностью РНК полимеразы II и формированием гранул ядерного стресса [Jolly C. et al., 2004]. Из этого был сделан вывод, что в условиях стресса участок гетерохроматина, который ранее считался молчащим, становится транскрипционно активным и приобретает свойства эухроматина [Jolly C. et al., 2004; Col E. et al., 2017; Feliciello I. et al., 2020]. Доказан также факт обратимости этого процесса. Биологическое значение данного явления к настоящему времени не выяснено. Традиционно считалось, что генетический материал, в зависимости от степени конденсации и активности, можно классифицировать на гетеро- и эухроматин. В настоящее время выделяют факультативный гетерохроматин, содержащий «молчащие» гены, и конститутивный гетерохроматин, преимущественно локализованный в околоцентромерных районах, который в основном содержит различные повторяющиеся ДНК сателлитные последовательности, функционально связанные с регуляцией активности генов [Langley S. A. et al., 2019; Suzuki Y. et al., 2020]. Установлено, что гетерохроматин, расположенный вблизи центромер, обеспечивающих места прикрепления для микротрубочек веретена во время деления клетки, играет фундаментальную роль в событиях, приводящих к надежному расхождению хромосом [Okita A. K. et al., 2019; Wong C. Y. Y. et al., 2020]. Районы центромерного и перицентромерного гетерохроматина, активность которых регулируется эпигенетически, являются критическими для завершения митоза [Wong C. Y. Y. et al., 2020]. Таким образом, стало очевидным, что конститутивный гетерохроматин в перицентромерных и центромерных регионах в определенной ситуации может перейти в состояние готовности к транскрипции [Nakagawa T., Okita A. K., 2019]. Не исключено, что выявленное нами увеличение района первичной перетяжки хромосомы 9, которое не было ассоциировано с крупным блоком гетерохроматина и имело обратимый характер при исследовании в динамике у больных ИКБ в острый период и при реконвалесценции, может быть связано с ответом клеток на стрессовые факторы, характерные для инфекционного процесса, и обусловлено транскрипционной активностью РНК полимеразы II, а

также формированием гранул ядерного стресса в перицентромерном районе гетерохроматина.

При выполнении настоящего исследования мы анализировали частоту не только структурных, но числовых хромосомных аберраций в лимфоцитах крови у больных ИКБ. В результате было установлено, что в ФГА-стимулированных клеточных культурах у больных с острым и хроническим ИКБ число полиплоидных, гипоплоидных клеток и клеток с эндоредупликацией было значительно выше, чем в группах контроля и у реконвалесцентов (Таблица 4). Наряду с этим, в культурах лимфоцитов, полученных от больных острым и хроническим ИКБ, было выявлено существенное повышение частоты клеток с патологией митоза, включая такие варианты, как отставание хромосом в мета-, ана- или телофазе, многогрупповые метафазы или многополюсный митоз, а также статистически значимое увеличение числа бинуклеаров и клеток с микроядрами (Таблица 7). В эксперименте *in vitro* на культуре фибробластов было показано, что образование многоядерной клетки обычно связано со слиянием клеток либо с делением ядра без последующего цитокинеза [Holt D.J., Grainger D.W., 2011]. Формирование подобных клеток *in vivo* может происходить при пролиферативном ответе на чужеродные антигены в очаге воспаления, при опухолевой метаплазии, а также при старении клеток [Ahmadzadeh K. et al., 2022]. В экспериментальной модели на мышах, инфицированных боррелиями, а также в биоптатах кожи пациентов из области мигрирующей кольцевой эритемы были выявлены многоядерные клетки, в цитоплазме которых были обнаружены фагоцитированные боррелии [Lochhead R. B. et al., 2019; Белов Б. С., 2021]. В результате проведённого нами эксперимента было установлено, что добавление в ФГА-стимулированную культуру лимфоцитов здоровых доноров живых *B. garinii* индуцирует различные дозозависимые варианты кариопатологических изменений в клетках: образование микроядер, нарушение расхождения хромосом, структурные аберрации хромосом, а также анеуплоидию, полиплоидию и увеличение района первичной перетяжки хромосомы 9, аналогичные тем цитогенетическим нарушениям в лимфоцитах,

которые были установлены у пациентов с ИКБ в острый период заболевания (Таблица 6, Рисунок 5, 7).

В ряде экспериментов, описанных в научной литературе, было исследовано влияние цитокинов или антицитокиновых антител при их добавлении в клеточные культуры на процесс формирования многоядерных гигантских клеток из моноцитов. Так, McNally A. K. и соавт. (2007) сообщили о том, что формирование двух различных морфологических вариантов многоядерных гигантских клеток может быть индуцировано разными цитокинами. Например, клетки типа Лангханса, имеющие несколько ядер, образуются из моноцитов при участии IFN-γ, а клетки типа гигантских клеток инородных тел с большим числом ядер формируются под влиянием IL-4 [McNally A. K. et al., 2007]. Было установлено, что пептидогликан бактериальной клеточной стенки, а также живые или убитые микобактерии туберкулеза, в сочетании с IFN-γ, гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором (GM-CSF) и IL-3 индуцируют образование в условиях *in vitro* Лангханс-подобных многоядерных клеток гранулём из $CD14^{+}/CD16^{-}$ моноцитов [Okamoto H. et al., 2004; Shrivastava P., Bagchi T., 2013]. Механизм формирования этих клеток связан с их слиянием, для чего необходим контакт между моноцитом (макрофагом) и микобактериями, активация TLR2-рецепторов и фагоцитоз бактериальных клеток [Shrivastava P., Bagchi T., 2013; Trout K. L., Holian A., 2019]. Вероятно, цитокин-опосредованные механизмы формирования многоядерных и полиплоидных лимфоцитов в процессе клеточного деления имели место и в нашем эксперименте, косвенным подтверждением чему является достоверная положительная корреляционная взаимосвязь между концентрацией IFN-γ в культуре клеток и количеством полиплоидных или бинуклеарных лимфоцитов у больных с острым ИКБ ($r= +0,77$, $p=0,003$).

Одним из механизмов формирования полиплоидии, равно как и других цитогенетических нарушений в клетках, является окислительное повреждение ДНК в составе хромосом в условиях митогенной стимуляции [Gorla G. R. et al., 2001]. В исследованиях Мандраковой Н. В. (2005) у больных ИКБ в остром периоде

инфекции была установлена прямая корреляционная зависимость между содержанием в сыворотке метаболитов оксида азота и концентрацией в крови IFN-γ и TNF-α, что указывало на существенную связь продукции метаболитов NO, функционированием цитокиновой сети и интенсивностью воспаления [Мандракова Н. В., 2005]. Экспериментально установлено, что некоторые продукты ПОЛ, так же как и реактивные метаболиты кислорода и азота, могут взаимодействовать с ДНК, оказывая мутагенный эффект [Luczaj W., Skrzydlewska E., 2003]. Было показано, что взаимодействие *B. burgdorferi* с мышиными макрофагами костного мозга или клетками Купфера приводит к активному фагоцитозу, индукции секреции NO и супероксид-анион радикала (O_2^-), которое было значительно более выраженным, чем при воздействии другим инфектогеном – *Leptospira interrogans* [Marangoni A. et al., 2006]. Как известно, на самых ранних этапах инфекционного процесса боррелии в коже активно взаимодействуют с макрофагами и лимфоцитами, с чем связано развитие мощного воспалительного ответа, сопровождающегося генерацией реактивных метаболитов кислорода и азота, образованием продуктов ПОЛ, цитокинов и других медиаторов воспаления [Ligor M. et al., 2012]. Существенное повышение в крови концентрации индикаторов окислительного стресса, ТБК-активных продуктов, нитратов и нитритов, диеновых конъюгатов, 4-гидрокси-2-ноненал, изомеров простагландинов (изопростены) было установлено рядом авторов у больных боррелиозом в острый период заболевания [Кощевец Е. С., 2002; Любезнова О. Н., 2004; Конькова-Рейдман А. Б., 2011; Luczaj W. et al., 2011; Ligor M et al., 2012, Бондаренко А. Л., 2018].

В результате проведённого исследования цитокинпродуцирующей активности мононуклеарных лейкоцитов крови мы обнаружили значительное повышение (относительно параметров контрольной группы и у здоровых реконвалесцентов), базальной, ФГА- и БАГ-индуцированной наработки провоспалительных цитокинов IFN-γ, TNF-α и IL-6 в культуре клеток, полученных от больных как с острым, так и с хроническим ИКБ (Таблицы 2, 3). При этом при

корреляционном анализе была выявлена положительная взаимосвязь между количеством лимфоцитов со структурными аберрациями хромосом и базальной концентрацией TNF-α (r= +0,74, p=0,005) и IFN-γ (r= +0,77, p=0,003) в супернатантах клеточных культур.

Известно, что при остром или хроническом инфекционном процессе, сопровождающимся активной наработкой медиаторов воспаления, происходит повышенное образование эндогенных факторов, повреждающих ДНК и способствующих геномной нестабильности иммуноцитов. Так, на первичной культуре эндотелиальных клеток было установлено, что TNF-α, являющийся регулятором активности индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS), способствует повышению продукции реактивных радикалов азота, что сопровождается усилением образования маркера окислительного повреждения ДНК – 8-оксо-7,8-дигидро-2'-дезоксигуанозина [Natarajan M. et al., 2007]. Усиление наработки провоспалительных цитокинов и интенсивность активации макрофагов коррелируют с увеличением численности клеток с микроядрами, что объясняет их появление при воспалении [Sierra J. C., et al., 2020]. Появление повышенного числа клеток с микроядрами сигнализирует о наличии повреждений хромосом, о снижении жизнеспособности клеток и нарушении их функциональной активности, а также может быть ассоциировано с апоптозом иммуноцитов [Ильинских Н. Н., 2011; Guo X. et al., 2019; Fenech M. et al. 2020; Zaguia N. et al., 2020].

Так, в проведённом нами исследовании в группе пациентов с острым ИКБ была установлена положительная корреляционная связь между количеством клеток с цитогенетическими нарушениями и количеством клеток, находящихся в состоянии апоптоза (r= +0,90, p=0,002). В то же время в культурах мононуклеарных клеток, полученных от пациентов с хронической формой ИКБ, доля цитогенетически повреждённых лимфоцитов отрицательно коррелировала с числом клеток, находящихся в состоянии апоптоза (r= –0,81, p=0,007). К настоящему времени известно, что ответ клетки на повреждение ДНК включает множество механизмов репарации, включение которых контролируется в

сверочных точках клеточного цикла с участием киназ ATM-Chk2 и ATR-Chk1 [Smith H. L. et al., 2020]. Механизмы, контролирующие прохождение клетки с поврежденной ДНК по клеточному циклу, приводят её либо к гибели путём апоптоза, либо вызывают долгосрочный арест клеточного цикла, с которым связано клеточное старение. Установлено, что в стареющих клетках наблюдается повышенная экспрессия некоторых генов, регулирующих митоз, а также сегрегацию хромосом, что приводит к нарушению расхождения хромосом при делении клетки и сопровождается нарушением морфологии ядра [Ohshima S., 2008; Barroso-Vilares M. et al., 2020]. Так, в эксперименте было показано, что добавление в культуру фибробластов на третьи сутки культивирования индуктора окислительного стресса пероксида водорода (H_2O_2) приводит к преждевременному старению этих клеток, формированию тетраплоидных клеток, клеток с патологическим (абортивным и незавершенным) митозом [Ohshima S., 2008]. При изучении морфологии клеток было обнаружено появление множества микроядер, увеличение числа клеток с ядрами, имеющими неправильные форму или фрагментацию, а также формирование бинуклеаров с признаками нарушения цитокинеза, патологических митозов с отставшими хромосомами в тетраплоидной субпопуляции [Ohshima S., 2008]. Вместе с тем известно, что полиплоидные (тетраплоидные) клетки являются митотически нестабильными и могут подвергаться двум последовательным биполярным мейозоподобным делениям с образованием гаплоидного набора, триплоидии или анеуплоидии в результате неравномерной сегрегации хромосом [Czarnecka-Herok J. et al., 2022; Sikora E. et al., 2022]. Появление полиплоидных клеток, по-видимому, связано с абортивным митозом вследствие отсутствия расхождения хромосом, а образование клеток с фрагментированными ядрами обусловлено неравномерной сегрегацией хромосом между дочерними клетками. Деформация же ядра может быть связана с образованием хромосомных мостов при нарушении расхождения дицентрических хромосом к полюсам клетки во время анафазы клеточного деления [Ohshima S., 2008].

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 существенное повышение, по сравнению с соответствующими показателями в интактном контроле, числа клеток с многогрупповой метафазой и многополюсным митозом, а также относительного количества лимфоцитов с отставанием хромосом в метафазе или ана- и телофазе (Таблица 6). К настоящему времени не доказано, что боррелии обладают некоторыми факторами патогенности, похожими на цитолетальные токсины грамотрицательных бактерий, блокирующих иммуноциты в ответ на повреждение ДНК в G_1- или G_2-фазе клеточного цикла при прохождении сверочных точек. Однако в экспериментах *in vitro* и на лабораторных животных показано, что боррелии способны активно проникать внутрь Т- и В-лимфоцитов, что приводит к активации продукции провоспалительных цитокинов, супероксид-анион-радикала и оксида азота, а также к стимуляции дозозависимого апоптоза Т-клеток [Cruz A. R. et al., 2008; Tan X. et al., 2022].

4.2 Пролиферативная и апоптотическая активность лимфоцитов периферической крови у больных ИКБ

Оптимальный ответ клетки на внешние активирующие сигналы зависит от баланса между пролиферацией и апоптозом [Зурочка А. В. и соавт., 2018]. В свою очередь реализация альтернативных программ клеточного ответа зависит от интенсивности регуляторных сигналов, продолжительности их воздействия, а также от исходного состояния самой клетки и компонентов её микроокружения [Деев Р. В. и соавт., 2018]. Внутриклеточная передача активационных стимулов, опосредующих пролиферативный ответ либо запрограммированную клеточную

гибель, подразумевает участие одних и тех же транскрипционных факторов. Так, например, ядерный фактор NF-κB с одной стороны опосредует экспрессию генов, ответственных за пролиферацию и определяющих резистентность клетки к апоптозу, таких как c-IAP1, c-IAP2 и XIAP, TRAF1 и TRAF2. С другой стороны, NF-κB принимает участие в передаче активационного сигнала апоптоза посредством регуляции транскрипции генов Fas, Fasl, DR 4, DR 5 и других инициаторов апоптоза. [Кунцевич Н. В., 2010].

Дисрегуляция в системе «пролиферация-апоптоз» является причиной нарушения количественного баланса эффекторных и регуляторных иммуноцитов и играет важную роль в патогенезе многих заболеваний (аутоиммунных, аллергических, инфекционных, опухолевых др.). Известно, что зрелые лимфоциты отвечают на стимуляцию антигенами преимущественно пролиферацией, что характеризует начальный этап иммунного ответа. При этом сохраняется определённая вероятность их вступления в активационный апоптоз. Таким образом, апоптоз является процессом, альтернативным пролиферации, а их соотношение может служит мерой результативности ответа клеток на активирующие сигналы [Луговая А. В. и соавт., 2019].

Выраженный пролиферативный ответ Т-клеток на боррелии с доминированием ответа Т-хелперов типа 1 и повышенной продукцией IFN-γ в острый период ИКБ имеет важное значение для эрадикации возбудителя [Pohl-Koppe A. et al., 1998; Widhe M. et al., 2004]. Однако для благоприятного исхода заболевания необходимо ограничение воспалительного процесса, обусловленное переключением на преобладание гуморального иммунного ответа и снижением числа реактивных клеток [Pohl-Koppe A. et al., 1998]. Поэтому в исходе заболевания большое значение играют процессы, регулирующие пролиферацию Т-лимфоцитов. Апоптоз активированных лимфоцитов, наблюдаемый в фазы подъема и снижения иммунного ответа, называется активационно-индуцированной клеточной смертью. Данный вид клеточной гибели Т-лимфоцитов является важным механизмом

иммунорегуляции, необходимым для снижения числа реактивных клеток, а её подавление, как правило, наблюдается при хронических инфекциях и аутоиммунных заболеваниях [Budd R. C., 2001]. По-видимому, неадекватный воспалительный ответ при затяжном и хроническом течении ИКБ также может быть ассоциирован с нарушением апоптоза реактивных клеток.

В результате проведённого нами 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 (Таблицы 8, 9). При этом, в отличие от культур у здоровых лиц, у пациентов с острым ИКБ регистрировались более низкие значения показателя ФГА-стимулированной реакции бластной трансформации (Таблица 9). 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 G_2/M-фазах клеточного цикла в интактных культурах, при их снижении в ФГА-индуцированных пробах (Таблица 10, Рисунок 8). При этом количество лимфоцитов в фазе G_0/G_1 при остром ИКБ в ФГА-стимулированных культурах оказалось выше контрольных значений, что косвенно может свидетельствовать об аресте клеточного цикла в G_1-фазе при митогенной стимуляции.

Полученные нами 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 (Таблица 7). 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 через 120 часов культивирования 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 (Рисунок 8, Таблица 10). При этом наиболее часто лимфоциты в фазах S и G_2/M встречались в БАГ-стимулированных культурах у больных с хроническим течением ИКБ (Таблица 10), 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. В культурах, индуцированных БАГ, количество клеток, находящихся в S- и G_2/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_2<0,01); доля клеток в G_2/M–фазе составила 1,83 [1,12; 2,65] % против 5,25 [3,52; 5,88] % в острый период инфекции (p_2<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. Полученные нами результаты во многом сопоставляются с данными других исследователей, которые наблюдали существенно повышенный пролиферативный ответ лимфоцитов на стимуляцию антигенами *B. burgdorferi* в культурах, полученных от больных острой или

хронической формами заболевания. К аналогичному выводу пришли F.R. Van de Schoor с соавт. [Van de Schoor F. R. et al., 2022], А.С. Бараулина с соавт. [Бараулина А. С. и соавт., 2008; Бараулина А. С. и соавт., 2010] и V. von Baehr с соавт. [von Baehr V. et al., 2012], которые показали, что в условиях *in vitro* в культурах мононуклеаров, полученных от больных острым и хроническим Лайм-боррелиозом, наблюдается существенное повышение спонтанного и стимулированного инактиврованными боррелиями *B. burgdorferi* пролиферативного ответа мононуклеарных клеток периферической крови и продукции ими IFN-γ, но не IL-4, по сравнению с контролем, что могло свидетельствовать о значительном доминировании цитокиновой продукции Т-хелперами типа 1 [Widhe M. et al., 2004; Van de Schoor F. R. et al., 2022].

Цитокины являются основными факторами, которые регулируют пролиферативную активность лимфоцитов [Черешнев В. А., Гусев Е. Ю., 2001]. Провоспалительные цитокины могут не только повышать, но и снижать функциональную активность клеток, действуя по принципу отрицательной обратной связи, например, путём индукции экспрессии ингибиторных молекул или посредством активации тирозинкиназ [Reid M. B. et al., 2002; Hodge D. R. et al., 2005; Ablamunits V. et al., 2010; Zhang L. et al., 2012]. Например, известно, что IFN-γ индуцирует экспрессию циклинзависимой киназы ингибитора p21Waf1, который требуется для IL-4-зависимой ингибиции пролиферации Т-лимфоцтов и макрофагов. IL-4, в свою очередь, ингибирует M-CSF-зависимую Cdk-2 и Cdk-4 активацию, которые необходимы для прохождения S-фазы клеточного цикла [Arpa L. et al., 2009]. В результате проведённого нами исследования цитокинпродуцирующей активности мононуклеарных лейкоцитов крови мы обнаружили значительное повышение (относительно параметров контрольной группы и у здоровых реконвалесцентов), базальной, ФГА- и БАГ-индуцированной наработки провоспалительных цитокинов IFN-γ, TNF-α и IL-6 в культуре клеток, полученной от больных как с острым, так и с хроническим ИКБ (Таблицы 2, 3). Таким образом, регистрируемые нами 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 значимые положительные корреляционные зависимости между количеством лимфоцитов, находящихся в фазах S и G_2/M клеточного цикла, и концентрацией IFN-γ в супернатантах соответствующих культур у больных острым ($r = +0,70$ и $+0,72$ при $p<0,01$) и хроническим боррелиозом ($r = +0,83$ и $+0,77$ при $p<0,01$). 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 стимулированной секреции данного цитокина была существенно ниже, чем в контрольной группе (Таблица 2). 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 Т-хелперов 1 типа, что сопровождается активной наработкой 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-G_0/G_1-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) (Таблица 11). Аналогичная картина наблюдалась и в культурах клеток, стимулированных ФГА. При том, 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 (Рисунок 9). 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 (Рисунок 9). 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_1<0,01) (Рисунок 9).

Количественный анализ клеток, инкорпорировавших бром-дезоксиуридин трифосфаты (Br-dUTP) и одновременно окрашенных пропидиум йодидом и анти-БДУ ФИТЦ-меченными 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 (Таблица 13). Так, у пациентов с острым ИКБ в культурах мононуклеарных клеток, 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 клеток, погибших путём апоптоза: 4,02 [1,88; 5,02]%. При этом, доля лимфоцитов, погибших в результате некроза, у больных ИКБ оказалась сопоставимой с контрольными значениями и не зависела от варианта течения заболевания (острое либо хроническое) (Таблица 14).

Для исследования влияния боррелий на апоптотическую активность клеток в культуре лимфоцитов, полученных от здоровых доноров, были использованы разные концентрации антигена (в соотношении лимфоцитов и бактериальных клеток как 1:10, 1:20 или 1:50). При выполнении экспериментальной части исследования мы установили, что повышение концентрации *B. garinii* приводило к существенному росту частоты апоптотически погибших клеток по сравнению с интактным контролем (Рисунок 11). 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] % (Рисунок 11).

Как известно, геном *B. burgdorferi s.l.* не содержит генов, которые позволяют им вырабатывать токсины как факторы вирулентности. Патогенность *B. burgdorferi s.l.* обусловлена действием как самой боррелии и её структурных компонентов, так и иммунопатологическими реакциями, которые спирохеты индуцируют в организме хозяина [Скрипченко Н. В., Балинова А. А., 2012]. До сих пор единственным известным фактором вирулентности *B. burgdorferi s.l.* являются поверхностные белки [Shapiro E. D. et al., 2000]. Различные генотипы *B. burgdorferi s.l.* обычно имеют несколько поверхностных белков: OspA, OspB, OspC, OspD, OspE, OspF, OspG. Апоптоз зрелых лимфоцитов осуществляется при их ответе на стимуляцию антигеном и развивается при «некомплектности» активирующего сигнала от макрофагов при отсутствии костимуляции через CD28 (в случае Т-клеток) или через CD40 (в случае В-клеток), дефиците факторов роста (для Т-клеток – IL-2), а также при повторном действии активационного стимула на уже активированные клетки [Newell M. K. et al., 1990; Von Boehmer H. et al., 1997]. Этому способствует экспрессия Т-лимфоцитами в процессе активации как Fas-рецептора, так и Fas-лиганда; их взаимодействие опосредует сигнал к индукции апоптоза, что закономерно происходит на поздних этапах иммунного ответа [Von Boehmer H. et al., 1997; Krammer P. H., 1999; Ярилин А. А. и соавт., 2000]. Более продолжительный срок жизни клеток памяти может быть обусловлен замедлением осуществления указанных механизмов активации апоптоза. 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, пациентов с острым ИКБ и реконвалесцентов (Таблица 11).

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 (Рисунок 12), 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. В качестве факторов, предрасполагающих к хроническому течению борелиозной 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 могут представлять интерес для разработки подходов к превентивной коррекции структурно-функционального статуса иммунокомпетентных клеток с целью профилактики хронизации боррелиозной инфекции.

Выявленное в эксперименте цитопатическое воздействие *B. garinii* на лимфоциты периферической крови, выражающееся в дозозависимой индукции апоптоза, хромосомных аберраций и нарушении нормального хода митоза, определяет перспективы дальнейшей разработки темы настоящего исследования.

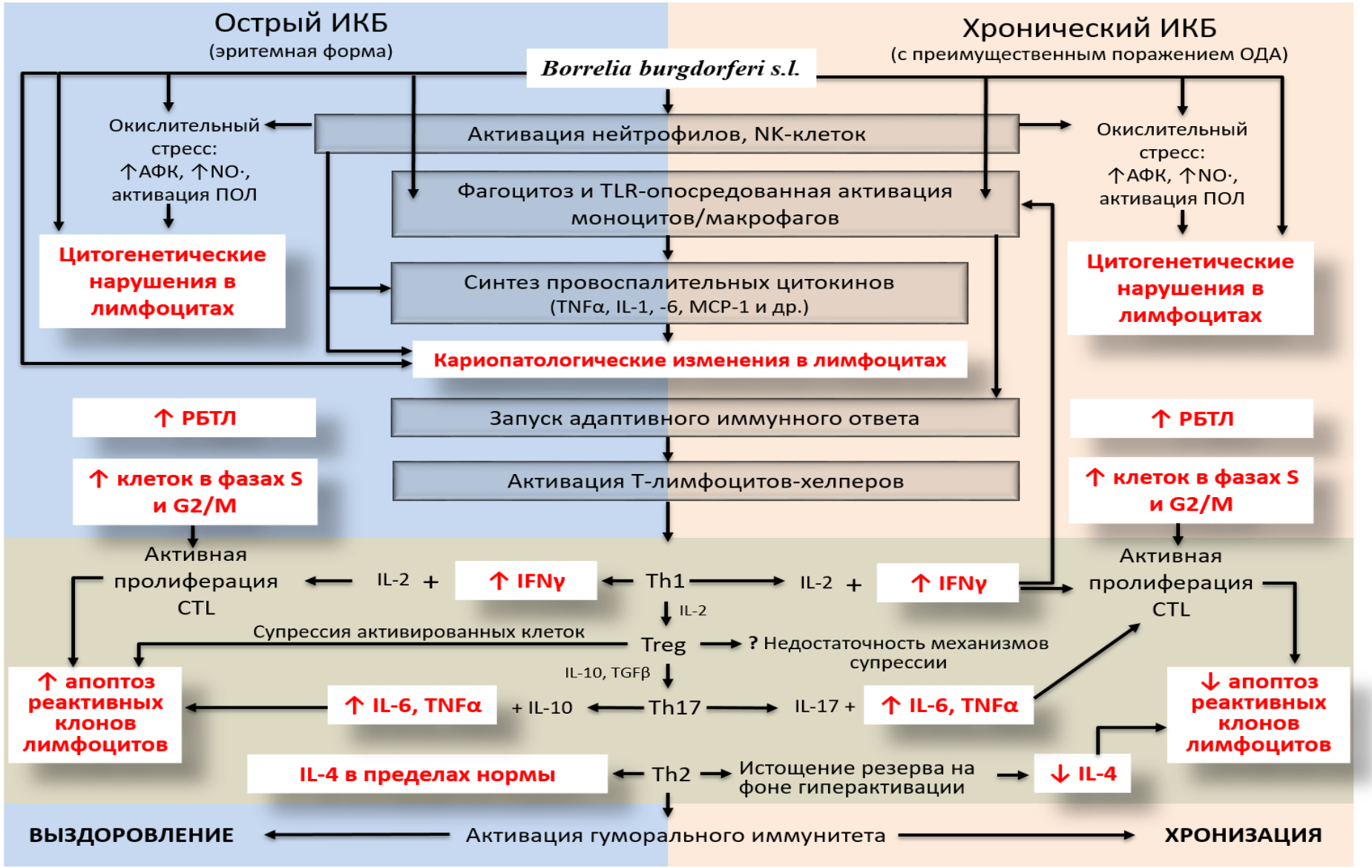

Рисунок 12 – Роль патогенетических факторов, характеризующих нарушения цитогенетического и функционального гомеостаза лейкоцитов периферической крови, в иммунопатогенезе боррелиозной инфекции (по данным литературы и результатам собственных исследований (выделено красным шрифтом)). ОДА – опорно-двигательный 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; NK-клетки – натуральные киллерные клетки (natural killer cells).

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]. Установлено, что клиническая картина ИКБ, особенности его течения и исходы в большой степени зависят от видовой принадлежности и генотипических особенностей возбудителя.

Так, патогномоничный признак ИКБ – мигрирующая эритема (МЭ) – наиболее часто наблюдается при инфицировании боррелиями видовой подгруппы *B. burgdorferi sensu lato*, в частности, *B. afzelii* (до 90% случаев), тогда как при инфицировании *B. garinii* МЭ выявляется примерно в 40% случаев, но характерным является преимущественное поражение нервной системы. Для инфекции, обусловленной *B. burgdorferi sensu stricto*, характерно поражение опорно-двигательного аппарата с длительным хроническим течением [Рудакова С. А. и соавт., 2021]. 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 [Колясникова Н. М. и соавт., 2018]. Например, белок BBK32, обеспечивающий адгезию возбудителя к поверхности эндотелия сосудов и способствующий диссеминации спирохет в ткани, встречается у представителей *B. burgdorferi s.l.*, но отсутствует у возбудителей возвратных клещевых лихорадок (в частности, *B. miyamotoi*), для клинико-лабораторной картины которых характерна бактериемия [Саркcян Д. С., 2015].

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.

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 аберрациями 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 аберрантный 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 аберрации) 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 наработки мононуклеарными лейкоцитами провоспалительных цитокинов IFN-γ, TNF-α, IL-6 в культуре *in vitro*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Активность нитроксидергических процессов при кишечных инфекциях / Н. С. Мининкова, М. А. Круглова, Т. В. Михеева и др. // Инфекционные болезни. – 2017. – Т.15. – № S1. – С. 177.
2. Алов, И. А. Цитофизиология и патология митоза / И. А. Алов. – М.: «Медицина», 1972. – 264 с.
3. Апоптоз и пролиферация Т-лимфоцитов периферической крови как альтернативные процессы в патогенезе сахарного диабета первого типа / А. В. Луговая, Н. М. Калинина, В. Ф. Митрейкин и др. // Медицинский алфавит. – 2019. – Т.1, № 4. – С. 16-20.
4. Апоптоз, роль в патологии и значимость его оценки при клинико-иммунологическом обследовании больных / А. А. Ярилин, М. Ф. Никонова, А. А. Ярилина и др. // Медицинская иммунология. – 2000. – Т.2, № 1. – С. 7-16.
5. Бактериальные эффекторы повреждений ДНК в клетках организма хозяина / В. Г. Дружинин, Е. Д. Баранова, В. Ю. Буслаев и др. // Экологическая генетика. – 2018. – Т.16, №3. – С. 26-36.
6. Белов, Б. С. Болезнь Лайма: современные подходы к профилактике, диагностике и лечению (по материалам международных рекомендаций 2020 г.) / Б. С. Белов, Л. П. Ананьева // Научно-практическая ревматология. – 2021. – Т.59, №5. – С. 547-554.
7. Бочков, Н. П. Спонтанный уровень хромосомных аберраций в культуре лейкоцитов человека / Н. П. Бочков, В. М. Козлов, Р. А. Пилосов и др. // Генетика. – 1968. – №6. – С. 196-198.
8. Владимиров, Ю. А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю. А. Владимиров, А. И. Арчаков – М.: Наука, 1972. – 252 с.
9. Внеклеточная ДНК в культуре первичных и трансформированных клеток, инфицированных и не инфицированных микоплазмой / Е. С. Морозкин, В.

Н. Сильников, Е. Ю. Рыкова и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2009. – Т.147, №1. – С. 67-70.

10. Геновидовая характеристика клещевых боррелиозов в России / С. А. Рудакова, Н. В. Рудаков, С. В. Штрек и др. // Фундаментальная и клиническая медицина. – 2021. – Т.1, №3. – С. 94-99.
11. Геновидовое разнообразие боррелий в иксодовых клещах на территории юга Западной Сибири / С. А. Рудакова, О. Е. Теслова, Н. Е. Канешова и др. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2019. – № 4. – С. 92-96.
12. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
13. Гольдберг, Е. Д. Методы культуры ткани в гематологии / Е. Д. Гольдберг, А. М. Дыгай, В. П. Шахов – Томск: Изд-во Томского ун-та, 1992. – 272 с.
14. Гюлазян, Н. М. Дифференциальная чувствительность гранулоцитов, моноцитов и лимфоцитов периферической крови к эндотоксининдуцированному апоптозу у больных, перенесших сальмонеллезную инфекцию. / Н. М. Гюлазян, Т. К. Давтян, С. Г. Пак // Клиническая лабораторная диагностика. – 2007. – № 2. – С. 20-23.
15. Дернова, А. С. Инфекционный мононуклеоз, вызванный вирусом Эпштейн-барр, в амбулаторной практике / А. С. Дернова, М. А. Косолапова // Бюллетень Северного государственного медицинского университета. – 2022. – №2. – С. 35.
16. Жукова, О. Б. Молекулярные механизмы нарушения апоптоза лимфоцитов при хронической вирусной инфекции / О. Б. Жукова // Бюллетень сибирской медицины. – 2006. – Т3, №3. – С 19-25.
17. Злобин, В. И. Клещевые трансмиссивные инфекции / В. И. Злобин, Н. В. Рудаков, И. В. Малов. // Наука: Новосибирский филиал Федерального государственного унитарного предприятия "Академический научно-издательский и книгораспространительский центр "Наука". – 2015. – 224 с.
18. Ильинских, Н. Н. Инфекционная кариопатология / Н. Н. Ильинских, В. В.

Новицкий, Е. Н. Ильинских и др. – Томск: Изд-во ТГУ, 2005. – 168 с.

19. Ильинских, Н. Н. Обнаружение инфекционного агента в иксодовом клеще методом цитогенетического анализа / Н. Н. Ильинских, Е. Н. Ильинских // Фундаментальная и клиническая медицина — 2016 — Т.1, №3. — С. 33-37.
20. Китаева, К. Р. Апоптоз и его роль в иммунной системе / К. Р. Китаева // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины – 2019. – С. 418.
21. Китаева, Л. В. Цитогенетические нарушения в слизистой оболочке фундального отдела желудка у пациентов с хроническим гастритом / Л. В. Китаева // Экологическая генетика. – 2010. – Т. 8, №1. – С. 36-41.
22. Клеточный иммунитет у реконвалесцентов иксодовых клещевых боррелиозов / Т. С. Запорожец, С. А. Сокотун, А. И. Симакова и др. // Инфекция и иммунитет. – 2019. – Т9, №5-6. – С. 695-702.
23. Клинико-иммунологические аспекты хронических иксодовых клещевых боррелиозов / Н. С. Миноранская, В. И. Черных, Е. П. Тихонова и др. // Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение. – 2020. – Т.34, №3. – С. 61-66.
24. Клинико-эпидемиологические особенности сальмонеллеза, вызванного *Salmonella munchen* / Н. П. Амплеева, В. Ф. Павелкина, М.В. Филькина и др. // Вестник Башкирского государственного медицинского университета. – 2019. – № 1. – С. 3-8.
25. Клинические и лабораторные аспекты острого боррелиоза, вызванного *Borrelia miyamotoi* / Н. М. Колясникова, Д. С. Сарксян, М. Г. Топоркова и др // Материалы научно-практических конференций в рамках VI Российского конгресса лабораторной медицины (РКЛМ 2020). – 2020 года. – С. 28-29.
26. Комплексная характеристика клинико-лабораторных показателей, концентрации IL-17A, IL-23, IL-33, IL-35 и специфических антител у пациентов с эритемной формой иксодового клещевого боррелиоза / А. Л. Бондаренко, Л. С. Карань, О. Н. Любезнова, В. В. Сапожникова // Русский

медицинский журнал. Медицинское обозрение. – 2018. – Т. 2. – № 8-2. – С. 55-61.

27. Конькова-Рейдман, А. Б. Эпидемиологическая и клинико-иммунологическая характеристика иксодовых клещевых боррелиозов (моно- и микст-инфекция с клещевым энцефалитом) в Южно-Уральском регионе России: автореф. дис. ... д-ра мед. наук / А. Б. Конькова-Рейдман. – Омск, 2011. – 43 с.
28. Кощевец, Е. С. Коррекция фенюльсом анемического синдрома и процессов перекисного окисления липидов в эритроцитах при клещевых нейроинфекциях: автореф. дис. … канд. биол. наук / Е. С. Кощевец. – Томск, 2002. – 24 с.
29. Кравченко, И. Э. Патогенетическое обоснование и терапевтическая коррекция нестабильности клеточного генома при ангине как стрептококковой инфекции (клинико-экспериментальное исследование): автореф. … д-ра мед. наук / И. Э. Кравченко. – М., 2011. – 24 с.
30. Кунцевич, Н. В. Роль нуклеарного фактора транскрипции NF-κB. В развитии отторжения трансплантата / Н. В. Кунцевич // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2010. – Т.12, №1. – С. 72-77.
31. Лакин, Г. Ф. Биометрия: Учебное пособие для биол. спец. вузов – 4-е изд., перераб. и доп. / Г. Ф. Лакин. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
32. Лубова, Л. В. *Borrelia miyamotoi* – новый вид спирохеты, патогенной для человека / Л. В. Лубова, Г. Н. Леонова // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2019. – Т.79, №3 – С. 7-13.
33. Лукаш, Л. Л. Регуляция изменчивости генома соматических клеток млекопитающих под влиянием экзогенных биологических факторов / Л. Л. Лукаш // Biopolymers and Cell. – 2004. – Т. 20, № 1-2. – С. 93-105.
34. Любезнова, О. Н. Состояние процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы при хроническом Лайм-боррелиозе / О. Н. Любезнова, С. А. Караваев // Сборник материалов Пироговской

конференции студентов и молодых ученых. – Москва, 2004. – Т.34, №3. – С. 18.

35. Мандракова, Н. В. Клинико-иммунологические особенности течения острого иксодового клещевого боррелиоза в Приморском крае : автореф. дис. … канд. мед. наук. / Н. В. Мандракова. – Владивосток, 2005. – 20 с.
36. Микроядерный анализ в оценке цитогенетической нестабильности / под ред. Н. Н. Ильинских – Томск: Издательство ТГПУ, 2011. – 312 с.
37. Миноранская, Н. С. Значение иммунного статуса для прогноза хронизации боррелиозной инфекции / Н. С. Миноранская, А. Н. Усков, П. В. Сарап // Журнал инфектологии. – 2014. – Т. 6, №1. – С. 35-40.
38. Молочный, В. П. Оксид азота нейтрофилов и перекисное окисление липидов в цереброспинальной жидкости у детей, больных гнойными менингитами / В. П. Молочный, О. Н. Солодовникова // Дальневосточный медицинский журнал. – 2013. – №2. – С. 17-19.
39. Мустафин, И. Г. Роль апоптоза лимфоцитов в патогенезе ВИЧ-инфекции: автореф. дис. … д-ра мед. наук / И. Г. Мустафин. – Казань, 2005. – 28 с.
40. Назаренко, Ю. С. Влияние вакцинаций на соматическую хромосомную нестабильность у животных и человека / Ю. С. Назаренко, С. Г. Куликова, С. И. Логинов // Роль аграрной науки в устойчивом развитии сельских территорий – 2020. – С. 516-519.
41. Норкин, М. Н. Роль апоптоза и анергии Т-клеток в патогенезе гнойно-септических заболеваний / М. Н. Норкин, О. Ю. Леплина // Медицинская иммунология. – 2000. – Т.2, №1. – С. 35-42.
42. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2022 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2023. – 368 с.
43. Особенности антиген-стимулированной цитокинопродукции в культуре клеток периферической крови пациентов с иксодовым клещевым

боррелиозом / А. С. Бараулина, А. В. Черников, Е. Н. Кологривова и др. // Сибирский медицинский журнал. – 2008. – Т.23, №3. – Выпуск 1. – С. 83.

44. Особенности продукции цитокинов при хронизации иксодового клещевого боррелиоза / А. С. Бараулина, Е. Н. Кологривова, О. Б. Жукова, и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2010. – №1. – С. 21-25.
45. Особенности этиологии и иммунопатогенеза иксодовых клещевых боррелиозов / С. Ф. Бикетов, В. В. Фирстова, И. И. Любимов // Проблемы особо опасных инфекций. – 2009. – №3. – С 44-49.
46. Перекисное окисление липидов у больных хроническими гастритами в зависимости от степени инфицированности *Helicobacter pylori* / А. В. Ефремова, Ф. Е. Стручкова, В. М. Николаев и др. // Якутский медицинский журнал. – 2010 – №2. – С. 39-42.
47. Пожилова, Е. В. Синтаза оксида азота и эндогенный оксид азота в физиологии и патологии клетки / Е. В. Пожилова, В. Е. Новиков // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2015. – Т.14. № 4. – С. 35-41.
48. Признаки иммунной недостаточности у больных с иксодовым клещевым боррелиозом / А. С. Бараулина, Е. Н. Кологривова, Н. А. Пронина, В. С. и др. // Российский аллергологический журнал. – 2008. – №1. – Прил. 1. – С. 30-31.
49. Прокофьева-Бельговская, А. А. Гетерохроматические районы хромосом / А. А. Прокофьева-Бельговская. – М.: Наука, 1986. – 430 с.
50. Проточная цитометрия в биомедицинских исследованиях / А. В. Зурочка, С. В. Хайдуков, И. В. Кудрявцев и др.// Уральское отделение РАН – Екатеринбург, 2018. – 720 с.
51. Раковская, И. В. Микоплазмы человека и микоплазменные инфекции: лекция Ч.1 / И. В. Раковская // Клиническая лабораторная диагностика. – 2005. – №2. – С.25-32.
52. Регуляция свободнорадикального окисления в крови и синовиальной

жидкости при посттравматическом гонартрозе / В. В. Внуков, И. В. Кролевец, С. Б. Панина и др. // Актуальные вопросы биологической физики и химии. – 2018. – Т.3, №3. – С. 579-583.

53. Роль апоптоза при инфекциях / И. С. Фрейдлин, Д. Т. Маммедова, Э. А. Старикова // Российский физиологический журнал им. И.М. Семенова – 2020. – Т.106, №12. – С. 1479–1495.
54. Рудаков, Н. В. Клещевые трансмиссивные инфекции Сибири: Практическое руководство; Омский НИИ природноочаговых инфекций Роспотребнадзора / Н. В. Рудаков, С. А. Рудакова // ООО "Издательский центр "Омский научный вестник" – 2019. – 146 с.
55. Сапожникова, В. В. Клинико-патогенетические особенности и факторы прогноза иксодового клещевого боррелиоза / В. В. Сапожникова // Кировский государственный медицинский университет. – Киров: Общество с ограниченной ответственностью «Издательство «Аверс» – 2020. – С. 194.
56. Сапронов, И. С. Биологические факторы мутагенеза и механизмы их действия / И. С. Сапронов // Актуальные научные исследования – 2022. – С. 69-72.
57. Саркcян, Д. С. Иксодовые клещевые боррелиозы - современное состояние проблемы / Д. С. Саркcян // Инфекционные болезни. – 2015. – Т. 13, № 2. – С. 61-67.
58. Скрипченко, Н. В. Современные представления о патогенезе иксодовых клещевых боррелиозов / Н. В. Скрипченко, А. А. Балинова // Журнал инфектологии. – 2012. – Т.4, №2. – С. 5-14.
59. Современные представления о клеточной гибели // Деев Р. В., Билялов А. И., Жампеисов Т. М. /. Гены и клетки. – 2018. – Т.13, №1. – С. 6-19.
60. Старые и новые клещевые инфекции в России. / В. В. Проворова, Е. И. Краснова, Н. И. Хохлова и др.// Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение. – 2019. – Т.8, №2 (29). – С. 102-112.
61. Трансмиссивные вирусные инфекции Западной Сибири (региональные

аспекты эпидемиологии, экологии возбудителей и вопросы микроэволюции) / В. В. Якименко, М. Г. Малькова, Ж. С. Тюлько и др.// Омск : Общество с ограниченной ответственностью «Издательский центр КАН» . – 2019. – 312 с.

62. Тюкавкина, С. Ю. Роль апоптоза в формировании иммунопатологических процессов, способствующих развитию инфекционных заболеваний / С. Ю. Тюкавкина // Иммунология. – 2013. – Т. 34, № 1. – С. 52-57.
63. Фролов, А. К. Цитогенетические изменения в лимфоцитах периферической крови и иммунитет у больных брюшным тифом и хронических бактерионосителей / А. К. Фролов // Цитология и генетика. – 1996. – Т. 13, № 5. – С. 361-365.
64. Цитогенетические нарушения у молодняка крупного рогатого скота при вакцинации против сальмонеллеза / С. Г. Куликова, С. И. Логинов, Ю. С. Назаренко, Н. С. Калинина // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2021. – Т.51, №3. – С. 92-103.
65. Цитогенетический статус и фенотипические свойства лимфоцитов периферической крови у больных иксодовым клещевым боррелиозом / Н. П. Пирогова, В. В. Новицкий, М. Ю. и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2005. – Т.4, №3. –С. 43-48.
66. Черешнев, В. А. Иммунология воспаления: роль цитокинов / В. А. Черешнев, Е. Ю. Гусев // Медицинская иммунология. – 2001. – Т.3, №3. – С. 361-368.
67. Эпидемиологические и клинические аспекты безэритемных форм иксодовых клещевых боррелизов в России / Н. М. Колясникова, Д. С. Сарксян, М. Г. Топоркова, и др. // Журнал МедиАль. – 2018. – Т.2, № 22. – С. 59-60.
68. A new tool for genotoxic risk assessment: Reevaluation of the cytokinesis-block micronucleus assay using semi-automated scoring following telomere and centromere staining / N. Zaguia, E. Laplagne, B. Colicchio et al. // Mutat Res

Genet Toxicol Environ Mutagen. – 2020. – Vol.850-851. – P.503143.

69. Acquisition of regulatory function by human CD8+ T cells treated with anti-CD3 antibody requires TNF / V. Ablamunits, B. Bisikirska, K. C. Herold // European Journal of Immunology. – 2010. – Vol.40. – P. 2891-2901.
70. Activation-induced cell death in CAR-T cell therapy / T. Huan, D. Chen, G. Liu et al. // Hum Cell. – 2022– Vol.35, N2. – P. 441-447.
71. Analysis of cell cycle-related Ki-67 and p120 expression by flow cytometric BrdUrd-Hoechst/7AAD and immunolabeling technique / E. Endl, P. Steinbach, R. Knüchel et al. // Cytometry. – 1997. – Vol.29, N3. – P. 233-241.
72. Analysis of the clinical features of pericentric inversion of chromosome 9 / X. Xie, F. Li, W. Tan et al. // J. Int. Med. Res. – 2020. – Vol.48, N9. – P. 1-9.
73. Artemisinin and its derivatives prevent Helicobacter pylori-induced gastric carcinogenesis via inhibition of NF-κB signaling / T. Su, F. Li, J. Guan et al. // Phytomedicine. – 2019. – Vol.63. – P. 152968.
74. Blockade of apoptosis as a rational therapeutic strategy for the treatment of sepsis / A. Ayala, D. E. Wesche-Soldato, M. Perl et al. // Novartis Found Symp. – 2007 – Vol.280 – P. 37-49.
75. Borna disease virus docks on neuronal DNA double-strand breaks to replicate and dampens neuronal activity / F. H. Marty, L. Bettamin, A. Thouard et al. // iScience. – 2021. – Vol.25, N1. – P. 103621.
76. *Borrelia burgdorferi* activates a T helper type 1-like cell subset in Lyme arthritis / H. Yssel, M. C. Shanafelt, C. Soderberg et al. // J. Exp. Med. – 1991. – N174. – P. 593-601.
77. *Borrelia burgdorferi* Is a Poor Inducer of Gamma Interferon: Amplification Induced by Interleukin-12 / F. R. Van de Schoor, H. D. Vrijmoeth, M. A. E. Brouwer et al. // Infect Immun. – 2022. – Vol.90, N3. – P. 558-621.
78. Borrelia-specific interferon-γ and interleukin-4 secretion in cerebrospinal fluid and blood during Lyme borreliosis in humans: association with clinical outcome / M. Widhe, S. Jarefors, C. Ekerfelt et al. // J. Infect. Dis. – 2004. – V.189, N10.

– P. 1881-1891.

79. Bromodomain factors of BET family are new essential actors of pericentric heterochromatin transcriptional activation in response to heat shock / E. Col, N. Hoghoughi, S. Dufour et al. // Sci Rep. –2017. – Vol.7, N1. – P.5418.
80. Bruner, S. D. Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA / S. D. Bruner, P. G. Normand, G. L. Verdine // Nature. – 2000. – Vol.403, N6772. – P. 859-866.
81. Budd, R. C. Activation-induced cell death / R. C. Budd // Curr. Opin. Immunol. – 2001. – V. 13, № 3. – P. 356-362.
82. Budd, R. C. Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis / R. C. Budd // J. Clin. Invest. – 2002. – Vol.109, N4. – P. 437-442.
83. Coevolution of markers of innate and adaptive immunity in skin and peripheral blood of patients with erythema migrans / J. C. Salazar, C. D. Pope, T. J. Sellati et al. // J. Immunol. – 2003. – Vol.171, N5. – P. 2660-2670.
84. Coiling Phagocytosis of *Borrelia burgdorferi* by Primary Human Macrophages Is Controlled by CDC42Hs and Rac1 and Involves Recruitment of Wiskott-Aldrich Syndrome Protein and Arp2/3 Complex / S. Linder, C. Heimerl, V. Fingerle et al. // Infect. Immun. – 2001. – Vol. 69. – P. 1739-1746.
85. Cutting Edge: Early Attrition of Memory T Cells during Inflammation and Costimulation Blockade Is Regulated Concurrently by Proapoptotic Proteins Fas and Bim / S. Jangalwe, V. N. Kapoor, J. Xu et al. // Immunol. – 2019. – Vol. 202, №3. – P. 647-651.
86. Cytolethal distending toxin: from genotoxin to a potential biomarker and anti-tumor target / S. Kailoo, Shreya, Y. Kumar // World J Microbiol Biotechnol. – 2021. – Vol.37, N9. – P.150.
87. Dai, C. The heat-shock, or HSF1-mediated proteotoxic stress, response in cancer: from proteomic stability to oncogenesis / C. Dai // Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. – 2018. – Vol.373, N1738. – P. 1-13.
88. Death of mature T cell by separate ligation of CD4 and the T-cell receptor for

antigen. / M. K. Newel, L. J. Haughn, R. C. Maroun et al. // Nature.-1990.-Vol.347. – P. 286-289.

89. Decreased up-regulation of the interleukin-12Rbeta2-chain and interferon-gamma 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 / S. Jarefors, C. K. Janefjord, P. Forsberg et al. // Clin Exp Immunol. – 2007. – Vol.147, N1 – P. 18-27.
90. Dietary Mixed Cereal Grains Ameliorate the Azoxymethane and Dextran Sodium Sulfate-Induced Colonic Carcinogenesis in C57BL/6J Mice / J. L. Song, J. S. Lee, H. Y. Kim et al. // J Med Food. – 2020. – Vol.23, N4. – P. 440-452.
91. DNA damage checkpoint kinases in cancer / H.L. Smith, H. Southgate, D.A. Tweddle et al. // Expert Rev Mol Med. – 2020. – Vol.22. – P. 2.
92. Dual Role of Hydrogen Peroxide as an Oxidant in Pneumococcal Pneumonia / M. A. Mraheil, H. A. Toque, L. La Pietra et al. // Antioxid Redox Signal. – 2021. – Vol.34, N12. – P.962-978
93. Dulipati, V. Complement evasion strategies of *Borrelia burgdorferi sensu lato* / V. Dulipati, S. Meri, J. Panelius // FEBS Lett. – 2020. – Vol.594, N16. – P. 2645-2656.
94. Early secreted antigenic target of 6-kDa of Mycobacterium tuberculosis promotes caspase-9/caspase-3-mediated apoptosis in macrophages / J. Lin, Q. Chang, X. Dai et al. // Mol Cell Biochem. – 2019. – Vol.457, N1-2. – P. 179-189.
95. Effect of Complement Component C3 Deficiency on Experimental Lyme Borreliosis in Mice / M. B. Lawrenz, R. M. Wooten, J. F. Zachary et al. // Infect. Immun. – 2003. – Vol.71. – P. 4432–4440.
96. Evaluation of The Pathogenic Potential of Insecticidal Serratia marcescens Strains to Humans / E. Konecka, J. Mokracka, S. Krzymińska et al. // Pol J Microbiol. – 2019. – Vol.68, N2. – P. 185-191
97. FIB/SEM-based analysis of *Borrelia* intracellular processing by human macrophages / M. Klose, M. Scheungrab, M. Luckner et al. // J. Cell Sci. – 2021.

– P.134.

98. From DNA Damage to Cancer Progression: Potential Effects of Cytolethal Distending Toxin. Front Immunol / Y. R. Lai, Y. F. Chang, J. Ma et al. // 2021. – N.12. – P. 1-8.
99. Functional interrogation of DNA damage response variants with base editing screens / R. Cuella-Martin, S. B. Hayward, X. et al. // Cell. – 2021. – Vol.184, N4. – P. 1081-1097.
100. Gal, A. Mutagenesis associated with nitric oxide production in transgenic SJL mice (mutationytransgenic miceypUR288) / A. Gal, G. N. Wogan // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1996. – Vol.93. – P. 15102-15107.
101. Gandhi, G. DNA damage studies in untreated and treated leprosy patients / G. Gandhi, B. Singh // Mutagenesis. – 2004. – Vol.19, N6. – P. 483-488.
102. Genetic host factors in Helicobacter pylori-induced carcinogenesis: Emerging new paradigms / M. C. Mommersteeg, J. Yu, M. P. Peppelenbosch et al. // Biochim Biophys Acta Rev Cancer. – 2018. – Vol.1869, N1. – P. 42-52.
103. Gorla, G. R. Polyploidy associated with oxidative injury attenuates proliferative potential of cells / G. R. Gorla, H. Malhi, S. Gupta // J. Cell Science. – 2001. – Vol.114. – P. 2943-2951.
104. Grzanka R. Tumor necrosis factor-alpha and Fas/Fas ligand signaling pathways in chronic spontaneous urticarial / R. Grzanka, A. Damasiewicz-Bodzek, A. Kasperska-Zajac // Allergy Asthma Clin Immunol. – 2019. – Vol.15 – P. 15.
105. Häcker, G. Apoptosis in infection / G. Häcker // Microbes and Infection. – 2018. – Vol.20, N9–10. – P. 552–559.
106. Haemophilus parasuis cytolethal distending toxin induces cell cycle arrest and p53-dependent apoptosis / G. Li, H. Niu, Y. Zhang et al. // PLoS One. – 2017. – Vol.12, N5. – P. 1-17.
107. Hammond, E. M. CD4 T cell responses in persistent *Borrelia burgdorferi* infection / E. M. Hammond, N. Baumgarth // Curr Opin Immunol. – 2022. – Vol. 77. – P. 1-20.

108. Haplotypes spanning centromeric regions reveal persistence of large blocks of archaic DNA / S. A. Langley, K. H. Miga, G. H. Karpen et al. // Elife. – 2019. – Vol.8. – P. 1-15
109. Heat Shock Affects Mitotic Segregation of Human Chromosomes Bound to Stress-Induced Satellite III RNAs / M. Giordano, L. Infantino, M. Biggiogera et al. // Int J Mol Sci. – 2020. – Vol.21, N8. – P.2812.
110. Heat Stress Affects H3K9me3 Level at Human Alpha Satellite DNA Repeats / I. Feliciello, A. Sermek, Ž. Pezer et al. // Genes (Basel). – 2020. – Vol.11, N6. – P. 663.
111. *Helicobacter pylori* CagA elicits BRCAness to induce genome instability that may underlie bacterial gastric carcinogenesis / S. Imai, T. Ooki, N. Murata-Kamiya et al. // Cell Host Microbe. 2021. – Vol.29, N6. – P. 941-958
112. *Helicobacter pylori* severely reduces expression of DNA repair proteins PMS2 and ERCC1 in gastritis and gastric cancer / Y. Raza, A. Ahmed, A. Khan et al. // DNA Repair (Amst). – 2020. – Vol.89. – P.102836.
113. Heterochromatin suppresses gross chromosomal rearrangements at centromeres by repressing Tfs1/TFIIS-dependent transcription / A. K. Okita, F. Zafar, J. Su et al. // Commun Biol. – 2019 – Vol.11, N2. – P. 17.
114. HIV Vpr Modulates the Host DNA Damage Response at Two Independent Steps to Damage DNA and Repress Double-Strand DNA Break Repair / D. Li, A. Lopez, C. Sandoval et al. // mBio. – 2020. – Vol.11, N4. – P. 1-18.
115. Hodge, D. R. The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer / D. R. Hodge, E. M. Hurt, W. L. Farrar // European Journal of Cancer. – 2005. – Vol.41, N16. – P. 2502–2512.
116. Holt, D. J., Grainger, D.W. Multinucleated Giant Cells from Fibroblast Cultures / D. J. Holt, D. W. Grainger // Biomaterials. – 2011. – Vol.32, №16. – P. 3977–3987.
117. Identification of a T cell subset capable of both IFN-γ and IL-10 secretion in patients with chronic *Borrelia burgdorferi* infection / A. Pohl-Koppe, K.

Balashov, A. C. Steere et al. // J. Immunol. – 1998. – Vol.160, N4. – P. 1804-1810.

118. IL-4 blocks M-CSF-dependent macrophage proliferation by inducing p21Waf1 in a STAT6-dependent way / L. Arpa, A. F. Valledor, J. Lloberas, A. Celada // European Journal of Immunology. – 2009. – Vol.39. – P. 514-526.
119. Impact of human CD95 mutations on cell death and autoimmunity: a model / K. Seyrek, N. V. Ivanisenko, F. Wohlfromm et al. // Trends Immunol. – 2022. – Vol.43, N1. – P.22-40.
120. Impaired host defense to infection and Toll-like receptor 2-independent killing of *Borrelia burgdorferi* clinical isolates in TLR2-deficient C3H/HeJ mice / G. Wang, Y. Ma, A. Buyuk et al. // FEMS Microbiol. Lett. – 2004. – Vol.231. – P. 219-225.
121. In vitro genotoxicity analyses of colibactin-producing E. coli isolated from a Japanese colorectal cancer patient / M. Kawanishi, Y. Hisatomi, Y. Oda et al. // J Toxicol Sci. – 2019. – Vol.44, N12. – P. 871-876.
122. Increased DNA damage and increased apoptosis and necrosis in patients with severe sepsis and septic shock / I. Bahar, G. Elay, G. Başkol et al. // J Crit Care. – 2018. – Vol.43. – P. 271-275.
123. Induction of and rescue from programmed cell death / H. Von Boehmer, A. Sarukhan, J. Buer // Immunologist. – 1997. – Vol.5. – P. 185-190.
124. Induction of apoptosis in human neutrophils by *Mycobacterium tuberculosis* is dependent on mature bacterial lipoproteins / A. Persson, R. Blomgran-Julinder, D. Eklund et al. // Microb. Pathog. – 2009. – Vol.47, N3. – P. 143-150.
125. Infection with genotoxin-producing *Salmonella enterica* synergises with loss of the tumour suppressor APC in promoting genomic instability via the PI3K pathway in colonic epithelial cells / O. C. B. Martin, A. Bergonzini, F. D'Amico et al. // Cell Microbiol. – 2019. – Vol.21, N12. – P. 1-14.
126. Inflammatory responses induced by *Helicobacter pylori* on the carcinogenesis of gastric epithelial GES1 cells / J. Wang, Y. Yao, Q. Zhang et al. // Int J Oncol. –

2019. – Vol.54, N6. – P. 2200-2210.

127. Influenza infection induces host DNA damage and dynamic DNA damage responses during tissue regeneration / N. Li, M. Parrish, T. K. Chan et al. // Cell Mol Life Sci. – 2015 – Vol.72, N15. – P. 2973-2988.
128. Inhibition of endoplasmic reticulum stress and the downstream pathways protects CD4+ T cells against apoptosis and immune dysregulation in sepsis / G. Lu, Q. Li, J. Liu et al. // IUBMB Life. – 2022. – P.10.
129. Innate immune responses in Lyme borreliosis: enhanced tumour necrosis factor-alpha and interleukin-12 in asymptomatic individuals in response to live spirochetes / J. Sjöwall, A. Carlsson, O. Vaarala et al. // Clin. Exp. Immunol. – 2005. – Vol.141, N1. – P. 89-98.
130. Krammer, P. H. CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die / P. H. Krammer // Adv. Immunol. – 1999. – Vol.71. – P.163-210.
131. Krammer, P. H. CD95's deadly mission in the immune system / P. H. Krammer // Nature. – 2000. – Vol.407, N6805. – P. 789-795.
132. Kulbacka, J. Oxidative stress in cells damage processes / J. Kulbacka, J. Saczko, A. Chwiłkowska // Pol. Merkur. Lekarski. – 2009. – Vol. 27, N157. – P. 44-47.
133. Kumar, S. The role of caspases as executioners of apoptosis / S. Kumar, L. Dorstyn, Y. Lim // Biochem Soc Trans. – 2022. – Vol.50, N1. – P. 33-45.
134. Kumar, V. Toll-like receptors in sepsis-associated cytokine storm and their endogenous negative regulators as future immunomodulatory targets / V. Kumar// Int Immunopharmacol. – 2020. – Vol.89. – P.1-25.
135. Kwinn, L. A., Nizet V. How Group A Streptococcus circumvents host phagocyte defenses / L. A. Kwinn, V. Nizet // Future Microbiol. – 2007. – Vol.2, N1. – P. 75-84.
136. Ligor, M. Application of medical and analytical methods in Lyme borreliosis monitoring / M. Ligor, P. Olszowy, B. Buszewski // Anal Bioanal Chem. – 2012. – Vol.402, N7. – P. 2233-2248.
137. Lipid peroxidation products as potential bioindicators of Lyme arthritis / W.

Luczaj, A. Moniuszko, M. Rusak et al. // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2011. – Vol.30, N3. – P. 415-422.

138. Luczaj, W. DNA damage caused by lipid peroxidation products / W. Łuczaj, E. Skrzydlewska // Cell Mol. Biol. Lett. – 2003. – Vol.8, N2. – P. 391-413.
139. Lyu, M. A. The immunocytokine scFv23/TNF sensitizes HER-2/neu-overexpressing SKBR-3 cells to tumor necrosis factor (TNF) via up-regulation of TNF receptor-1 / M. A. Lyu, M. G. Rosenblum // Mol Cancer Ther. – 2005 – Vol.4, N8 – P. 1205-1213.
140. Macrocyclic colibactin induces DNA double-strand breaks via copper-mediated oxidative cleavage / Z. R. Li, J. Li, W. Cai et al. // Nat Chem. – 2019. – Vol.11, N10. – P. 880-889.
141. Macrophage mediated recognition and clearance of *Borrelia burgdorferi* elicits MyD88-dependent and -independent phagosomal signals that contribute to phagocytosis and inflammation / S. J. Benjamin, K. L. Hawley, P. Vera-Licona et al. // BMC Immunol. – 2021. – Vol 22, N1. – P. 16.
142. Maeda, H. The link between infection and cancer: tumor vasculature, free radicals, and drug delivery to tumors via the EPR effect / H. Maeda // Cancer Sci. – 2013. – Vol. 04, N7. – P. 779-789.
143. Manipulation of Autophagy and Apoptosis Facilitates Intracellular Survival of Staphylococcus aureus in Human Neutrophils / M. E. Mulcahy, E. C. O'Brien, K. M. O'Keeffe et al. // Front Immunol. – 2020. – Vol.11. – P.1-14.
144. Manna, G. K. The genotoxic potential of the bacterium, Serratia marcescens in mice as experimental model / G. K. Manna, A. Sadhukhan // Nat. Acad. Sci. Lett. – 1990. – Vol.13, N7. – P. 273-288.
145. Martin, O. C. B. Bacterial Genotoxin-Induced DNA Damage and Modulation of the Host Immune Microenvironment / O. C. B. Martin, T. Frisan // Toxins (Basel). – 2020. – Vol.12, N2. – P. 63.
146. McNally, A. K. Alpha subunit partners to beta1 and beta 2 integrins during IL-4-induced foreign body giant cell formation / A. K. McNally, S. R. MacEwan, J. M.

Anderson // J. Biomed. Mater. Res. A. – 2007. – Vol.82, N3. – P. 568-574.

147. Mertens, M. E. Herpes Simplex Virus 1 Manipulates Host Cell Antiviral and Proviral DNA Damage Responses / M. E. Mertens, D. M. Knipe // mBio. – 2021. –Vol.12, N1. – P. 1-22.
148. Methods for distinguishing apoptotic from necrotic cells and measuring their clearance / D. V. Krysko, T. Vanden Berghe, E. Parthoens et al. // Methods Enzymol. – 2008. – Vol.442. – P. 307-341.
149. Microarray Analyses of Inflammation Response of Human Dermal Fibroblasts to Different Strains of *Borrelia burgdorferi Sensu Stricto* / F. Schramm, A. Kern, C. Barthel et al. // PLoS ONE. – 2012. – Vol.7, N6. – P. 1-10.
150. Micronuclei as biomarkers of DNA damage, aneuploidy, inducers of chromosomal hypermutation and as sources of pro-inflammatory DNA in humans / M. Fenech, S. Knasmueller, C. Bolognesi et al. // Mutat Res Rev Mutat Res. – 2020. – Vol.786. – P.108342.
151. miR-18a reactivates the Epstein-Barr virus through defective DNA damage response and promotes genomic instability in EBV-associated lymphomas / P. Cao, M. Zhang, I. Wang et al. // BMC Cancer. –2018. –Vol.18, N1. – P. 1293.
152. Molecular and genomic characterization of pathogenic traits of group A Streptococcus pyogenes / S. Hamada, S. Kawabata, I. Nakagawa // Proc. Jap. Ac. Phys. Biol. Sci. – 2015. – Vol.91, N10. – P. 539-559.
153. Montgomery R.R., Malawista S.E. *Borrelia burgdorferi* and the macrophage: Routine annihilation but occasional haven? / R. R. Montgomery, S. E. Malawista // Parasitol. Today. – 1994. – Vol.10. – P. 154-157.
154. Müllegger, R. R. Differential expression of cytokine mRNA in skin specimens from patients with erythema migrans or acrodermatitis chronica atrophicans / R. R. Müllegger et al. // J. Invest. Dermatol. – 2000. – Vol.115, N6. – P. 1115-1123
155. Multinucleated Giant Cells: Current Insights in Phenotype, Biological Activities, and Mechanism of Formation / K. Ahmadzadeh, M. Vanoppen, C.D. Rose et al. // Front Cell Dev Biol. – 2022. – Vol.10. – P. 1-22.

156. Murata-Kamiya, N. Helicobacter pylori-induced DNA double-stranded break in the development of gastric cancer / N. Murata-Kamiya, M. Hatakeyama // Cancer Sci. – 2022. – Vol.113, N6. – P.1909-1918.
157. Mycoplasma fermentans infection promotes immortalization of human peripheral blood mononuclear cells in culture. / S. Zhang, S. Tsai, T. T. Wu et al. // Blood. – 2004. – Vol.104, N13. – P. 4252-4259.
158. Naj, X. Actin-Dependent Regulation of *Borrelia burgdorferi* Phagocytosis by Macrophages / X. Naj, S. Linder // Curr. Top. Microbiol. Immunol. – 2016. – Vol.399. – 133-154.
159. Nakagawa, T. Transcriptional silencing of centromere repeats by heterochromatin safeguards chromosome integrity / T. Nakagawa, A. K. Okita // Curr Genet. – 2019. – Vol.65, N5. – P. 1089-1098.
160. Nardelli, D. T. Lyme arthritis: current concepts and a change in paradigm / D. T. Nardelli, S. M. Callister, R. F. Schell // Clin. Vaccine Immunol. – 2008. – Vol.15, N1. – P. 21-34.
161. Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity / J. Zhang, V. L. Dawson, T. M. Dawson et al. // Science. – 1994. – Vol.263, N5147. – P. 687-689.
162. Not all cancers are created equal: Tissue specificity in cancer genes and pathways / J. J. Bianchi, X. Zhao, J. C. Mays et al. // Curr Opin Cell Biol. – 2020. – Vol.63. – P.135-143.
163. Ohshima, S. Abnormal mitosis in hypertetraploid cells causes aberrant nuclear morphology in association with H2O2-induced premature senescence / S. Ohshima // Cytometry Part A. – 2008. – Vol.73, N9. – P. 808-815.
164. Okamoto, H. Human monocyte-derived multinucleated giant cells / H. Okamoto, K. Mizuno, T. Horio // Nihon Hansenbyo Gakkai Zasshi. – 2004. – Vol.73, N3. – P. 245-251.
165. Oral and intestinal bacterial exotoxins: Potential linked to carcinogenesis / M. Silbergleit, A. A. Vasquez, C. J. Miller et al. // Prog Mol Biol Transl Sci. – 2020.

– Vol.171 – P. 131-193.

166. Overexpression of Mcl-1 exacerbates lymphocyte accumulation and autoimmune kidney disease in lpr mice / N.S. Anstee, C.J. Vandenberg, K.J. Campbell et al. // Cell Death Differ. – 2017. – Vol.24, N3. – P. 397-408.
167. Oxidative stress signalling: a potential mediator of tumour necrosis factor α-induced genomic instability in primary vascular endothelial cells / M. Natarajan, C. F. Gibbons, S. Mohan et al. // British Journal of Radiology – 2007. – Vol.80. – P. 13-22.
168. Oxidative/antioxidant balance and matrix metalloproteinases level in the knee cartilage of rats under experimental osteoarthritis and probiotic administration / O. Korotkyi, K. Dvorshchenko, L. Kot et al. // The Ukrainian Biochemical Journal. – 2020. – Vol.92, N6. – P. 126-136.
169. p53-independent expression of p21(CIP1 /WAF1) in plasmacytic cells during G(2) cell cycle arrest induced by Actinobacillus actinomycetemcomitans cytolethal distending toxin / T. Sato, T. Koseki, K. Yamato et al. // Infect. Immun. – 2002. – Vol.70, N2. – P. 528-534.
170. Pacher, P. Role of the peroxynitrite-poly(ADP-ribose) polymerase pathway in human disease / P. Pacher, C. Szabo // Am J Pathol. – 2008 – Vol.173, N1 – P. 2-13.
171. Pathophysiological Role of Peroxynitrite Induced DNA Damage in Human Diseases: A Special Focus on Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) / B. U. Islam, S. Habib, P. Ahmad et al. // Indian J Clin Biochem. – 2015 – Vol.30, N4 – P. 368-385.
172. Peter, M. E. The CD95(APO – 1 /Fas) DISC and beyond / M. E. Peter, P. H. Krammer // Cell Death Differ. – 2003. – Vol.10, N1. – P. 26-35.
173. Phagocytosis of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete, potentiates innate immune activation and induces apoptosis in human monocytes / A. R. Cruz, V. M. Moore, C. J. La Vake et al. // Infect. Immun. – 2008. – Vol.76, N1. – P. 56-70.

174. Phagocytosis-induced apoptosis in macrophages is mediated by up-regulation and activation of the Bcl-2 homology domain 3-only protein Bim / S. Kirschnek, S. Ying, S. F. Fischer et al. // J. Immunol. – 2005. – Vol.174, N2. – P. 671-679.
175. Pillars article: lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis / R. Watanabe-Fukunaga, C. I. Brannan, N. G. Copeland et al. // J Immunol. – 2012 – Vol.1, N189 – P. 5101-5104.
176. Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) and PARP Inhibitors: Mechanisms of Action and Role in Cardiovascular Disorders / R. J. Henning, M. Bourgeois, R. D. Harbison // Cardiovasc Toxicol. – 2018. – Vol.18, N6. – P. 493-506
177. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition with HYDAMTIQ reduces allergen-induced asthma-like reaction, bronchial hyper-reactivity and airway remodeling / L. Lucarini, A. Pini, E. Gerace et al. // J Cell Mol Med. – 2014 – Vol.18, N3 – P. 468-479.
178. Production of reactive oxygen species and expression of inducible nitric oxide synthase in rat isolated Kupffer cells stimulated by Leptospira interrogans and *Borrelia burgdorferi* / A. Marangoni, S. Accardo, R. Aldini et al. // World J. Gastroenterol. – 2006. – Vol.12, N19. – P. 3077-3081.
179. Profound Tissue Specificity in Proliferation Control Underlies Cancer Drivers and Aneuploidy Patterns / L. M. Sack, T. Davoli, M. Z. Li et al. // Cell. – 2018. – Vol.173, N2. – P. 499-514.
180. Profound Tissue Specificity in Proliferation Control Underlies Cancer Drivers and Aneuploidy Patterns / L. M. Sack, T. Davoli, M. Z. Li et al. // Cell. – 2018. – Vol.173, N2. – P. 499-514.
181. Rapid and ongoing evolution of repetitive sequence structures in human centromeres / Y. Suzuki, E. W. Myers, S. Morishita // Sci Adv. – 2020. – Vol.6, N50. – P. 1-10.
182. Recognition of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme Disease Spirochete, by TLR7 and TLR9 Induces a Type I IFN Response by Human Immune Cells / M. M. Petzke, A. Brooks, M. A. Krupna et al. // J. Immunol. – 2009. – Vol.183. – P. 5279-5292.

183. Regulation of macrophage activity by surface receptors contained within *Borrelia burgdorferi*-enriched phagosomal fractions / A. Carreras-González, D. Barriales, A. Palacios et al. // PLoS Pathog. – 2019. – Vol.15. – P. 1-23.
184. Respiratory and limb. Musklweakness induced du tumor necrosis factoralpha: involvement of muscle myofilaments / M. B. Reid, J. Lännergren, H. Westerblad // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. – 2002. – Vol.166, N4. – P. 479-484.
185. Revisiting the Tissue Microenvironment of Infectious Mononucleosis: Identification of EBV Infection in T Cells and Deep Characterization of Immune Profiles / M.H.M. Barros, G. Vera-Lozada, P. Segges et al. //. Front Immunol. – 2019. – Vol.10. – P. 146.
186. Robust interferon signature and suppressed tissue repair gene expression in synovial tissue from patients with postinfectious, *Borrelia burgdorferi*-induced Lyme arthritis / R. B. Lochhead, S. L. Arvikar, J. M. Aversa et al. // Cell Microbiol. – 2019 – Vol.21, N2. – P. 12954.
187. Role of Apoptosis in HIV Pathogenesis / C. Jabea Ekabe, N. Asaba Clinton, E. K. Agyei et al. // Adv Virol. – 2022. – Vol.2022. – P. 1-10.
188. Role of mycobacteria-induced monocyte /macrophage apoptosis in the pathogenesis of human tuberculosis / M. Bocchino, D. Galati, A. Sanduzzi et al. // Int. J. Tuberc. Lung. Dis. – 2005. – Vol.9, N4. – P. 375-383.
189. Role of nitrative and oxidative DNA damage in inflammation-Related carcinogenesis / M. Murata, R. Thanan, N. Ma et al. // J. Biomed. Biotechnol. – 2012. – Vol.2012. – P. 1-11
190. Role of nitric oxide in pathogenesis of tumor growth and its possible application in cancer treatment / V. V. Holotiuk, A. Y. Kryzhanivska, I. K. Churpiy et al. // Exp Oncol. – 2019. – Vol.41, N3. – P. 210-215.
191. Role of Peroxynitrite-Induced Activation of Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) in Circulatory Shock and Related Pathological Conditions / B. U. Islam, S. Habib, S. A. Ali et al. // Cardiovasc Toxicol. – 2017. – Vol. 17, N 4. – P. 373-

383

192. Role of the microenvironment in mantle cell lymphoma: IL-6 is an important survival factor for the tumor cells / L. Zhang, J. Yang, J. Qian, et al. // Blood. – 2012. – Vol.120, N18. – P. 3783-3792.
193. Schoeler, G. B. Ixodes scapularis: effects of repeated infestations with pathogen-free nymphs on macrophage and T lymphocyte cytokine responses of BALB/c and C3H/HeN mice / G. B. Schoeler, S. A. Manweiler, S. K. Wikel // Exp Parasitol. – 1999. – Vol.92, N4. – P. 239-248.
194. Seabright, M. A rapid banding technique for human chromosomes / M. A. Seabright // Lancet. – 1971. – Vol.2, N7731. – P. 971-972.
195. Shapiro, E. D. Lyme disease / E. D. Shapiro, M. A. Gerber // Clin. Infect. Dis. – 2000. – №31. – P. 533-542.
196. Shemenski, J. Cimetidine as a novel adjunctive treatment for early stage Lyme disease / J. Shemenski // MedHypotheses. – 2019. – Vol. 128 – P. 94-100.
197. Shrivastava, P. IL-10 modulates in vitro multinucleate giant cell formation in human tuberculosis / P. Shrivastava, T. Bagchi // PLoS One. – 2013 – Vol.17, N8 (10) – P. 1-8.
198. Signaling of apoptosis through TLRs critically involves toll/IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta, but not MyD88, in bacteria-infected murine macrophages / K. Ruckdeschel, G. Pfaffinger, R. Haase et al. //. J. Immunol. – 2004 – Vol.173, N5 – P. 3320-3328.
199. Skare, J. T., Garcia B.L. Complement Evasion by Lyme Disease Spirochetes. / J. T. Skare, B. L. Garcia // Trends Microbiol. – 2020. – Vol.28. – P. 889-899.
200. Small-molecule inhibition of aging-associated chromosomal instability delays cellular senescence / M. Barroso-Vilares, J. C. Macedo, M. Reis et al. // EMBO Rep. – 2020. – Vol.21, N5. – P. 1-15.
201. Spermine oxidase mediates Helicobacter pylori-induced gastric inflammation, DNA damage, and carcinogenic signaling / J. C. Sierra, M. B. Piazuelo, P. B. Luis et al. // Oncogene. – 2020. – Vol.39, N 22. – P. 4465-4474.

202. Sprent, J. T cell death and memory / J. Sprent, D. F. Tough // Science. – 2001. – Vol.293, N5528. – P. 245-248.
203. Strakova, N. Klebsiella pneumoniae producing bacterial toxin colibactin as a risk of colorectal cancer development - A systematic review / N. Strakova, K. Korena, R. Karpiskova // Toxicon. – 2021. – Vol.197. – P. 126-135.
204. Streptococcus pneumoniae and Its Virulence Factors H2O2 and Pneumolysin Are Potent Mediators of the Acute Chest Syndrome in Sickle Cell Disease / J. Gonzales, T. Chakraborty, M. Romero et al. // Toxins (Basel) . – 2021. – Vol.13, N2. – P.157.
205. Streptolysin O Promotes Group A Streptococcus Immune Evasion by Accelerated Macrophage Apoptosis / A. M. Timmer, J. C. Timmer, M. A. Pence et al. // J. Biol. Chem. – 2009. – Vol.284, N2. – P. 862-871.
206. Stress-induced transcription of satellite III repeats / C. Jolly, A. Metz, J. Govin et al. // J. Cell Biol. – 2004. – Vol.164, N1. – P. 25-33.
207. Summer, A. T. New technique for distinguishing between chromosomes / A. T. Summer, H. J. Evans, R. A. Buckland // Nature. – 1971. – Vol. 232, N 27. – P. 31-32.
208. Thakur, J. Sequence, Chromatin and Evolution of Satellite DNA / J. Thakur, J. Packiaraj, S. Henikoff // Int J Mol Sci. – 2021. – Vol.22, N9. – P. 4309.
209. The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2 / A. O. Aliprantis, R. B. Yang, D. S. Weiss et al. // EMBO J. – 2000. – Vol.19, N13. – P. 3325-3336.
210. The Cell-Cycle Regulatory Protein p21CIP1/WAF1 Is Required for Cytolethal Distending Toxin (Cdt)-Induced Apoptosis / B. J. Shenker, L. M. Walker, A. Zekavat et al. // Pathogens. – 2020. – Vol.9, N1. – P. 38.
211. The C-terminal coiled-coil domain of Corynebacterium diphtheriae DIP0733 is crucial for interaction with epithelial cells and pathogenicity in invertebrate animal model systems / D. Weerasekera, F. Stengel, H. Sticht et al. // BMC Microbiol. – 2018. – Vol.18, N1. – P. 106.

212. The *H. pylori* CagA Oncoprotein Induces DNA Double Strand Breaks through Fanconi Anemia Pathway Downregulation and Replication Fork Collapse / A. M. Kolinjivadi, H. Sankar, R. Choudhary et al. // Int J Mol Sci. – 2022. – Vol.23, N3. – P. 1661.
213. The lymphocyte transformation test for borrelia detects active lyme borreliosis and verifies effective antibiotic treatment / V. von Baehr, C. Doebis, H. D. Volk et al. // Open Neurol. J. – 2012. – Vol.6. – P. 104-112.
214. The mechanism of Jurkat cells apoptosis induced by Aggregatibacter actinomycetemcomitans cytolethal distending toxin / H. P. Chen, L. Li, X. Chen et al. // Apoptosis. – 2017 – Vol. 22, N 6. – P. 841-851.
215. The molecular origins and pathophysiological consequences of micronuclei: New insights into an age-old problem / X. Guo, J. Ni, Z. Liang et al. // Mutat Res Rev Mutat Res. – 2019. – Vol.779. – P.1-35.
216. The role of host immune cells and *Borrelia burgdorferi* antigens in the etiology of Lyme disease / D. Verhaegh, L. A. Joosten, M. Oosting // Eur. Cytokine Netw. – 2017. – Vol.28. – P. 70-84.
217. The role of porins in neisserial pathogenesis and immunity / P. Massari, S. Ram, H. Macleod et al. // Trends Microbiol. – 2003. – Vol.11, N2. – P. 87-93.
218. Therapy-induced polyploidization and senescence: Coincidence or interconnection? / E. Sikora, J. Czarnecka-Herok, A. Bojko et al. // Semin Cancer Biol. – 2022. – Vol.81. – P. 83-95.
219. Therapy-Induced Senescent/Polyploid Cancer Cells Undergo Atypical Divisions Associated with Altered Expression of Meiosis, Spermatogenesis and EMT Genes / J. Czarnecka-Herok, M. A. Sliwinska, M. Herok et al. // Int J Mol Sci. – 2022. – Vol.23, N15. – P.8288.
220. Tick-borne pathogens *Bartonella spp*., *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Coxiella burnetii* and *Rickettsia spp*. may trigger endocarditis / T. Chmielewski, M. Kuśmierczyk, B. Fiecek et al. // Adv Clin Exp Med. – 2019. – Vol.28, N7. – P. 937-943.

221. Toll-Like Receptor Signaling and Its Role in Cell-Mediated Immunity / T. Duan, Y. Du, C. Xing et al. // Front Immunol. – 2022. – Vol.13. – P.1-22
222. Trout, K. L. Factors influencing multinucleated giant cell formation in vitro / K. L. Trout, A. Holian // Immunobiology. – 2019. – Vol.224, N6. – P. 834-842.
223. VlsE, the nexus for antigenic variation of the Lyme disease spirochete, also mediates early bacterial attachment to the host microvasculature under shear force / X. Tan, Y. P. Lin, M. J. Pereira et al. // PLoS Pathog. – 2022. – Vol.18, N5 – P. 1-27.
224. Wong, C. Y. Y. Epigenetic regulation of centromere function / C. Y. Y. Wong, B. C. H. Lee, K. W. Y. Yuen // Cell Mol Life Sci. – 2020. – Vol.77, N15. – P. 2899-2917.