

- sandwich ELISA: the rarities or practically important phenomena? J. Immunoassay. Immunochem. 2013, 34: 414-437.
5. Nikulina V.A., Kizim E.A., Massino Y.S., Segal O.L., Smirnova M.B., Avilov V.V., Saprigin D.B., Smotrov S.P., Tichtchenko V.A., Kolyaskina G.I., Dmitriev A.D. Synergistic effects in antigen-capture ELISA using three monoclonal antibodies directed at different epitopes of the same antigen. Clin. Chim. Acta. 2000, 299: 25-44.
 6. Pardue H.L. The inseparable triad: analytical sensitivity, measurement uncertainty, and quantitative resolution. Clin. Chem. 1997, 43: 1831-1837.
 7. Polson A., von Wechmar M.B., Fazakerley G. Antibodies to proteins from yolk of immunized hens. Immunol Commun. 1980, 9: 495-514.
 8. Schade R., Calzado E. G., Sarmiento R. et al. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. Altern. Lab Anim. 2005, 33: 129-154.
 9. Spillner E., Braren I., Greunke K. et al. Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research, diagnostics and therapy. Biologicals. 2012, 40: 313-22.

Поступила 20.08.15

Контактная информация: Дмитриев Дмитрий Александрович, к.б.н.,
115088, Москва, М.Казенный пер., 5а, р.т. (495)917-49-00

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

Е.В.Сорокина¹, Н.К.Ахматова¹, С.А.Сходова¹, Е.Л.Чалая², С.А.Масюкова²

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ РАННЕЙ ЭРИТЕМНОЙ СТАДИИ БОЛЕЗНИ ЛАЙМА С УЧЕТОМ ОСОБЕННОСТЕЙ ИММУНОГЕНЕЗА

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, ²Медицинский институт усовершенствования врачей высшего профессионального образования Московский государственный университет пищевых производств, Москва

Цель. Изучение врожденного и адаптивного иммунитета у больных мигрирующей эритемой, клинической эффективности комбинированной терапии с применением вакцин Иммуновак и динамики иммунологических показателей в результате терапии. *Материалы и методы.* Обследованы 37 взрослых пациентов с мигрирующей эритемой. Больные были разделены на 2 группы: 1 гр. (14 чел.) — Иммуновак интраназально-подкожным методом на фоне базисной терапии; 2 гр. (23 чел.) — терапия доксициклином 200 мг/сут 21 день. Перед началом лечения и через 1 месяц после терапии у больных были изучены: фагоцитарная активность нейтрофилов крови; экспрессия TLRs на мононуклеарных лейкоцитах периферической крови (МЛПК) и клетках кожи в очагах методом проточной цитометрии с применением МАТ к TLR2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 с использованием проточного цитометра FC-500; субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови; уровень про-, противовоспалительных и регуляторных цитокинов в сыворотке крови методом ИФА; IgG, IgM, IgA в сыворотке крови. *Результаты.* У больных мигрирующей эритемой выявлен высокий уровень экспрессии TLR2, 4, 7, 8 на клетках кожи в очагах, TLR2, 4 — на клетках крови; низкое содержание CD95+ и CD25+, высокий уровень в сыворотке IL-1b, IL-2 и IL-4, повышение уровня общего IgE. Иммуновак способствовал повышению CD95+ и CD25+, синтезу IFN-γ, в большей степени снижал уровень общего IgE, чем базисная терапия. *Заключение.* Включение в терапию больных мигрирующей эритемой Иммуновак способствует повышению клинической эффективности и коррелирует с коррекцией иммунологических нарушений.

Журн. микробиол., 2016, № 3, С. 51—56

Ключевые слова: мигрирующая эритема, Toll-подобные рецепторы, вакцина Иммуновак

EFFECTIVENESS OF APPLICATION OF COMBINED THERAPY OF EARLY ERYTHEMA STAGE OF LYME DISEASE TAKING INTO CONSIDERATION IMMUNOGENESIS FEATURES

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, ²Medical Institute of Doctors' Improvement of Higher Professional Education Moscow State University of Food Production, Moscow, Russia

Aim. Study innate and adaptive immunity in patients with migrating erythema, clinical effectiveness of combined therapy using Immunovac vaccine and dynamics of immunologic parameters as a result of the therapy. *Materials and methods.* 37 adult patients with migrating erythema were examined. The patients were divided into 2 groups: 1st gr. (14 individuals) — Immunovac by intranasal-subcutaneous method against the background of basic therapy; 2nd gr. (23 individuals) — 200 mg/day doxycycline therapy for 21 days. Phagocytic activity of blood neutrophils; TLRs expression on mononuclear leukocytes of peripheral blood (PBML) and skin cells in foci by flow cytometry with mAT against TLR2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 using flow cytometer FC-500; subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes; levels of pro-, anti-inflammation and regulatory cytokines in blood sera by EIA method; IgG, IgM, IgA in blood sera were studied in patients before treatment and 1 month after therapy. *Results.* A high level of TLR2, 4, 7, 8 on skin cells in foci, TLR2, 4 — on blood cells; low content of CD95+ and CD25+, high level of serum IL-1b, IL-2 and IL-4, an increase of general IgE level was detected in patients with migrating erythema. Immunovac facilitated an increase of CD95+ and CD25+, IFN- γ synthesis, reduced the level of general IgE in a more pronounced way than basic therapy. *Conclusion.* Inclusion of Immunovac into therapy of patients with migrating erythema facilitates increase of clinical effectiveness and correlates with correction of immunologic disorders.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 3, P. 51—56

Key words: migrating erythema, Toll-like receptors, Immunovac vaccine

ВВЕДЕНИЕ

В структуре эритем наиболее распространенной на сегодняшний день остается мигрирующая эритема Афцелиуса-Липшутца (МЭ), являющаяся патогномоничным признаком Лайм-боррелиоза (ЛБ) — широко распространенного трансмиссивного заболевания. В Российской Федерации ежегодно количество заболевших клещевыми боррелиозами колеблется от 7 до 9 тысяч случаев [6, 7]. В 2011 году частота заболеваемости иксодовым клещевым боррелиозом составила 7,02 на 100 тыс населения [4]. В последние десятилетия отмечается рост частоты тяжелых хронических торпидных форм болезни Лайма, склонных к рецидивированию [6, 7, 9, 11].

МЭ, как правило, регрессирует спонтанно в течение 1 — 2 месяцев, но может длительно персистировать от 6 до 12 месяцев [10]. Терапия ЛБ наиболее эффективна на ранних стадиях инфекции, благоприятный исход заболевания и выздоровление зависят от своевременности начатого этиотропного лечения. Однако, несмотря на длительную антибиотикотерапию большими разовыми дозами, хронизация инфекции наступает у 3,5 — 30% больных. При лечении хронических форм эффективность этиотропной терапии составляет 43,2 — 48,7% [2, 5]. Развитие МЭ при болезни Лайма как стадии локальной инфекции, вызванной *Borrelia burgdorferi*, происходит на фоне недостаточности клеточных или гуморальных факторов неспецифической резистентности организма [1, 3, 7, 8]. Поэтому при хроническом течении инфекции в основе патогенетической терапии лежит иммунокоррекция. Нарушения функционирования иммунной системы у больных как хронической, так и острой формой ЛБ указывают на целесообраз-

ность их коррекции с целью предотвращения развития тяжелых торпидных форм. Целью исследования явилось изучение клинической эффективности комбинированной терапии больных мигрирующей эритемой с применением Иммуновак и динамики иммунологических показателей в результате терапии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Иммунологические исследования включали изучение фагоцитарной активности нейтрофилов крови. Изучение экспрессии TLRs на МЛПК проводили методом проточной цитометрии с применением МАТ к TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, TLR9 (Caltag Laboratories, США) с использованием проточного цитометра FC-500 (Beckman Coulter, США). Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови определяли методом проточной цитометрии. Определение уровня про-, противовоспалительных и регуляторных цитокинов в сыворотке крови проводили методом ИФА; исследование IgG, IgM, IgA в сыворотке крови — методом радиальной иммунодиффузии. Перед началом терапии все больные были разделены на 2 группы. Группа 1 (14 больных) получала Иммуновак на фоне базисной антибактериальной терапии. Иммуновак вводили назально-подкожным методом (3 ежедневных введения препарата и последующие 8 — 10 подкожных инъекций с интервалом 3 — 4 дня, начиная с дозы 0,05 мл на первую инъекцию, 0,1 мл — на вторую и 0,2 — 0,4 мл — при последующих введениях препарата). Иммуновак разработана в НИИВС им. И.И. Мечникова, разрешена к применению в практике здравоохранения (ЛРС-001294/10 от 24.02.2010 для подкожного введения и ЛРС-001293/10 от 24.02.2010 для интраназального введения), производится НПО «Микроген» (Уфа). Вторая группа (23 больных) получала только базисную терапию: доксициклин 200 мг в сутки в 2 приема в течение 21 дня, а также по показаниям — проведение детоксикационной терапии. Статистическую обработку результатов проводили в рамках базовой статистики с использованием t-критерия Стьюдента, U-критерия Манн-Whitney, критерия Wilcoxon, применяя стандартный пакет статистических программ Windows 7, Excel и WinMdi. Различия рассматривались как значимые при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Под нашим наблюдением находились 37 больных мигрирующей эритемой в возрасте от 21 до 65 лет с длительностью заболевания от 14 дней до 72 дней. У 81,08% (30 больных) наблюдались единичные очаги, у 18,92% (7 чел.) отмечалось развитие вторичных эритем, не связанных с местом первичного аффекта, с преимущественной локализацией их в области головы, шеи, туловища.

При определении методом ИФА антител в сыворотке крови IgM к антигенам *B. burgdorferi* (OspA, p41) были обнаружены у 64,86% (24 больных), у 37,84% (14 чел.) — к OspC. Выявление антител к OspC у пациентов с мигрирующей эритемой свидетельствует о хорошей реактивности у 37,84% больных.

В результате изучения экспрессии TLRs на МЛПК у больных хронической МЭ выявлен высокий уровень содержания клеток с экспрессией TLR2 ($25,1 \pm 4,6\%$), превышающий нормальные значения в группе здоровых лиц в 4 раза. Количество TLR4 экспрессирующих клеток у больных было также выше нормальных значений в 3,5 раза ($13,8 \pm 4,5\%$). Число TLR3 и TLR9 позитивных клеток также превышало нормальные значения, составляя $59,9 \pm 5,8\%$ и $57,1 \pm 6,7\%$ соответственно. В группе больных МЭ выявлена высокая обратная корреляционная связь между длительностью заболевания и уровнем экспрессии TLR2, 4, 3, 9, что может свидетельствовать об истощении и снижении активации врожденных механизмов при развитии воспалительного процесса.

При исследовании у 13 больных экспрессии TLRs клетками кожи наблюдали достоверные различия в экспрессии TLR2, 7, 8. Уровень экспрессии TLR2 и TLR4

в очагах с длительностью существования до 30 дней (7 больных, $19,4 \pm 4,3$ и $13,6 \pm 3,8\%$ соответственно) был достоверно выше, чем в более длительно существующих очагах (6 больных, $5,8 \pm 1,6$ и $6,8 \pm 2,5\%$ соответственно). Известно, что первый барьер при проникновении экзогенных патогенов в человеческой коже представляют кератиноциты, которые формируют резистентность к инфекции благодаря функционированию осуществляемых ими иммунных механизмов. В обследуемой группе больных МЭ выявлена высокая обратная корреляционная зависимость между длительностью существования очагов эритемы и экспрессией на клетках кожи в очагах TLR2 ($r = -0,946$), TLR4 ($r = -0,944$) ($p < 0,05$). TLR2 и TLR4 необходимы для распознавания ЛПС; TLR2, димеризуясь с TLR1, распознает триацилированные липопотеины, такие как *B. burgdorferi* OspA. Поэтому в исследуемой группе больных МЭ выявленная гиперэкспрессия TLR2, 4 МЛПК и в коже указывает на распознавание липопотеинов боррелий и является маркером активности инфекционного процесса. Снижение экспрессии TLR2 по мере развития заболевания в длительно существующих очагах может отражать дисфункции в системе TLR, частично объясняя хронизацию и рецидивирование инфекции в результате нарушения кооперации клеток врожденного и как следствие — адаптивного иммунитета. У больных МЭ выявлена высокая прямая корреляционная связь между длительностью заболевания и экспрессией TLR7 ($r = 0,937$) и TLR8 ($r = 0,956$) ($p < 0,05$). Поэтому гиперэкспрессия этих рецепторов может отражать развитие хронического воспаления в коже и являться прогностическим маркером хронизации болезни Лайма. Также выявлена прямая корреляционная связь между тяжестью течения эритемной формы болезни Лайма и уровнем экспрессии TLR2 ($r = 0,587$), TLR4 ($r = 0,571$), TLR9 ($r = 0,680$) на клетках кожи ($p < 0,05$).

Проведение исследования фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови показало у больных МЭ повышение цитологического показателя ($0,35 \pm 0,06$ у.е.) по сравнению с нормальными значениями.

В результате проведения оценки содержания субпопуляций лимфоцитов периферической крови выявили снижение содержания лимфоцитов с маркерами CD95+ ($36,8 \pm 7,4\%$) и CD8+ ($21,6 \pm 2,1\%$) на фоне повышения относительного содержания В-лимфоцитов CD72+ ($16,9 \pm 2,8\%$). Относительные значения содержания CD25+ составляли $8,2 \pm 2,3\%$ и приближались к нижней границе нормальных значений. Уровень лимфоцитов, экспрессирующих на своей мембране молекулы антигенного представления (HLA-DR⁺), находился на верхней границе нормальных значений, составляя $20,1 \pm 2,8\%$.

При изучении цитокинового профиля у больных МЭ в сыворотке крови исходно наблюдали значительное повышение уровня провоспалительных цитокинов IL-1b, IL-2 и IL-4, их средние значения составили ($19,6 \pm 1,9$ и $37,2 \pm 2,7$ пг/мл на фоне повышения уровня IL-4 и IL-5 (до $21,8 \pm 4,7$ и $19,9 \pm 2,1$ пг/мл) и снижения регуляторного цитокина IFN- γ ($19,2 \pm 3,1$ пг/мл) по сравнению с группой здоровых лиц. Основными мишенями IL-4, продуцируемого Th2 клетками, являются В-лимфоциты. IL-4 служит ростовым фактором для В-лимфоцитов, может вызывать их пролиферацию без дополнительных стимулов. IL-4 является функциональным антагонистом IFN- γ как при непосредственном действии на клетки (подавляет выработку IFN- γ и ослабляет некоторые его эффекты), так и при индукции образования Th2 клеток. Анализ полученных данных позволяет предполагать активацию Т-лимфоцитов по Th2 пути при МЭ, поскольку происходит увеличение экспрессии IL-4 и, соответственно, снижение находящегося в конкурентных отношениях с ним IFN- γ . В группе больных МЭ выявили высокую прямую корреляционную связь между тяжестью течения болезни Лайма и уровнем сывороточных провоспалительных цитокинов IL-4 ($0,572$) и IL-5 ($0,650$) ($p < 0,05$), что указывает на прогностическую значимость определения данных ци-

токсинов. У больных МЭ наблюдали повышение уровня общего IgE до $187,8 \pm 28,4$ кЕ/л, что согласуется с повышенной экспрессией IL-4.

Больные первой и второй групп терапию переносили хорошо. Изучение терапевтического эффекта начали с оценки длительности регресса очагов МЭ в ходе терапии. В группе, получавшей комбинированную терапию, средние значения длительности разрешения очагов составили $12,17 \pm 2,51$ дней, при базисной терапии — $16,04 \pm 2,37$ дней. При изучении динамики уровня специфических антител выявили, что в результате всех видов терапии через 6 месяцев произошла негативация антител у большинства больных. В группе 1 IgM к *B. burgdorferi* выявили у 3 чел. (OspA, p41 - у 1 чел. и OspC — у 2 больных). IgG выявили у 5 чел. (VlsE — у 4 чел., p100, 39,18 — у 1 чел.). В группе 2 IgM (OspA, p41 и OspC) выявили у 3 и 3 чел. соответственно, IgG (VlsE) — у 3 больных. Таким образом, в сроки наблюдения 6 месяцев негативация титров IgM к OspA, p41, OspC *B. burgdorferi* в группе 1 отмечена у 78,6%, в группе 2 — у 74% больных. Через 12 месяцев после терапии специфические IgG к антигенам (VlsE) наблюдали только в группе 2, получавшей базисную терапию — 13%(3) больных, что потребовало проведения повторного курса лечения. Нарастание титра антител в процессе лечения в обеих группах выявлено не было.

При изучении динамики иммунологических показателей в результате терапии выявлено, что комбинированная терапия существенно не повлияла на экспрессию TLR2,4,3, в то время как уровень экспрессии TLR2 и TLR3 в группе, получавшей только базисную терапию, снизился с $25,1 \pm 7,6$ до $15,3 \pm 5,5$ и с $59,9 \pm 9,8$ до $32,7 \pm 2,1$ соответственно. Экспрессия TLR4 повышалась после лечения в группе, получавшей Иммуновак. В результате терапии происходило снижение исходно значительно повышенного уровня экспрессии TLR9 в равной степени в двух группах с $57,1 \pm 9,7$ до $39,8 \pm 2,6$ и $37,4 \pm 5,3$ соответственно, что приводило к нормализации этого показателя.

В результате комбинированной терапии у больных отмечено увеличение фагоцитарной активности лейкоцитов, что нашло отражение в повышении фагоцитарного индекса с $52,3 \pm 4,7$ до $75,8 \pm 4,9\%$. Анализ субпопуляций лимфоцитов в группе больных МЭ после лечения выявил последовательное достоверное повышение процентного и абсолютного содержания лимфоцитов CD8+ в группе, получавшей комбинированную терапию, с $21,6 \pm 2,1\%$ и $526,8 \pm 42,7$ кл/мкл до $32,9 \pm 2,4\%$ и $790,0 \pm 50,0$ кл/мкл. В ходе иммунотерапии в периферической крови больных на лимфоцитах отмечалась тенденция к повышению исходно очень низких значений ($8,2 \pm 2,3\%$) активационных молекул CD25+ до $11,5 \pm 1,2\%$, повышение CD95+ с $36,8 \pm 7,4$ до $52,4 \pm 4,9\%$. В группе, получавшей комбинированную терапию, отмечено увеличение содержания CD16+ до $17,2 \pm 1,7\%$, в то время как базисная терапия снижала этот показатель ($10,1 \pm 3,3\%$). В группе, получавшей базисную терапию, отмечена тенденция к снижению содержания T-лимфоцитов CD3+ до $926,4 \pm 88,9$ кл/мкл, к еще большему снижению уровня CD25+ до $7,5 \pm 1,6\%$, T-регуляторных клеток CD8+ ($480,2 \pm 58,4$ кл/мкл); CD95+ до $31,4 \pm 6,8\%$.

Комбинированная терапия вызывала значительное повышение синтеза IFN- γ с $19,2 \pm 3,1$ до $42,8 \pm 2,5\%$ ($p < 0,05$). При базисной терапии уровень IFN- γ оставался без существенной динамики. В результате терапии наблюдали снижение IL-4 до $12,1 \pm 3,5$ пг/мл ($p < 0,05$) и $15,8 \pm 3,9$ пг/мл ($p > 0,05$), тенденцию к нормализации повышенного уровня IL-1b, IL-5. Тенденция к снижению IL-2 отмечена в группе, получавшей базисную терапию ($24,1 \pm 5,2$ пг/мл).

В группе больных МЭ в результате терапии отмечено снижение исходно высокого уровня общего IgE, в большей степени в группе, получавшей комбинированную терапию (с $187,8 \pm 28,4$ до $31,7 \pm 5,8$ и $64,7 \pm 4,9$ кЕ/л). Терапия не повлияла на исходно находящиеся в пределах нормальных значений IgG, IgA, IgM.

В ходе исследования выявлены иммунологические особенности ранней эритемной стадии болезни Лайма в виде высокого уровня экспрессии TLR2,4 на клетках крови и на клетках кожи и гиперэкспрессии TLR7, TLR8 на клетках кожи в очагах; низкого содержания CD95+ и CD25+, значительного увеличения в сыроворотке уровня IL-1b, IL-2 и IL-4 и повышения уровня общего IgE.

Регресс клинических симптомов был более выражен в группе, получавшей комбинированную терапию с применением Иммуновак. Иммуновак содержит лиганды для TLR, ассоциированных с патогенезом бактериальных инфекций, поэтому иммунотерапия Иммуновак, повышая экспрессию TLR4 у больных мигрирующей эритемой, способствует активации механизмов врожденного иммунитета, в том числе против *B. burgdorferi*, и как следствие — более эффективной элиминации патогена, что находит отражение в полном регрессе клинических проявлений эритемной стадии болезни Лайма к 28 дню терапии и негативации титров специфических антиборрелиозных антител в результате терапии к 12 месяцу наблюдения. Иммунотерапия с применением Иммуновак способствовала повышению в периферической крови больных на лимфоцитах CD95+ и нормализации содержания CD25+, вызывала значительное повышение синтеза IFN- γ , в большей степени снижала исходно высокий уровень общего IgE, чем традиционная терапия.

Таким образом, включение в терапию больных мигрирующей эритемой Иммуновак способствует повышению клинической эффективности и коррелирует с коррекцией иммунологических нарушений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бараулина А.С., Кологривова Е.Н., Пронина Н.А. и др. Признаки иммунной недостаточности у больных иксодовым клещевым боррелиозом. РАЖ. 2008, 1: 30-31.
2. Воробьева Н.Н. Клиника, лечение и профилактика иксодовых клещевых боррелиозов. Метод. реком. Пермь, Урал-пресс., 1998.
3. Колчина А.С. Иммунопатогенетические основы хронизации иксодового клещевого боррелиоза. Дисс. канд мед наук. М., 2010.
4. Коренберг Э.И. Инфекции, передающиеся иксодовыми клещами в лесной зоне, и стратегии их профилактики: изменение приоритетов. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2013, 5: 7-17.
5. Лесняк О.М. Лайм-боррелиоз. Екатеринбург, Изд-во Уральской гос. мед. акад., 1999.
6. Лобзин Ю.В., Усков А.Н., Козлов С.С. Лайм-боррелиоз (иксодовые клещевые боррелиозы). СПб, Фолиант, 2000.
7. Манзенюк И.Н., Манзенюк О.Ю. Клещевые боррелиозы (болезнь Лайма). 2005.
8. Diterich I., Harter L., Hassler D. et al. Modulation of cytokine release in ex vivo-stimulated blood from borreliosis patients. Infect. Immun. 2001, 69: 687-694.
9. Ferrandiz-Pulido C., Garcia-Patos V. A review of causes of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in children. Arch. Dis. Child. 2013, 98 (12): 998-1003.
10. Mahalingam N., Bhawan J., Chomat A., Hu L. Lyme-Borreliosis. In: Wolff K., Lowell A. et al. (ed.). Fitzpatrick's Dermatology in general medicine. McGraw-Hill Companies Inc., 2008, p. 1797-1806.
11. Wei C.Y., Ko T.M., Shen C.Y., Chen Y.T. A recent update of pharmacogenomics in drug-induced severe skin reactions. Drug. Metab. Pharmacokinet. 2012, 27 (1): 132-141.

Поступила 30.09.15

Контактная информация: Сорокина Екатерина Вячеславовна, к.м.н.,
105064, Москва, М. Казенный пер., 5а. р.т. (495)917-49-00