

BORRELIA MIYAMOTOI ВЛИЯЕТ НА ФОРМИРОВАНИЕ ГЕТЕРОАГРЕГАТОВ ТРОМБОЦИТОВ И НЕЙТРОФИЛОВ IN VITRO И ОБРАЗОВАНИЕ ТРОМБОВ EX VIVO.



А.А. Филькова¹, А.В. Титков², А.Н. Свешникова¹, А.Е. Платонов².

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия.

² ФБУН «Центральный НИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия.



Введение

Иксодовый клещевой боррелиоз, вызванный *B. miyamotoi*, (ИКБ-БМ) – «новое» инфекционное заболевание, отличающееся полиморфизмом клинических проявлений на фоне выраженного лихорадочного синдрома. В частности, почти у половины больных ИКБ-БМ наблюдается тромбоцитопения (с концентрацией тромбоцитов $<150 \cdot 10^9/\text{л}$) и различные микроциркуляторные нарушения, которые гипотетически могут отчасти обуславливать органные нарушения, наблюдаемые при ИКБ-БМ. Однако механизмы влияния *B. miyamotoi* на систему свертывания крови, в том числе на количество и активность тромбоцитов, до сих пор не выяснены.

Цель

Выявление прямого либо опосредованного действия *B. miyamotoi* на функциональную активность тромбоцитов.

Материалы и методы

Исследование проведено на крови здоровых доноров с согласия этического комитета ЦНИИЭ. Кровь забиралась в вакуумные пробирки с цитратом натрия либо гирудином. Богатая тромбоцитами плазма инкубировалась 60 минут с *B. miyamotoi* при 37°C. Влияние *B. miyamotoi* на агрегацию тромбоцитов измерялось на агрегометре Chronolog 490 (рис.1). Тромбоциты активировались АДФ (0.625-5мкМ). Активация нейтрофилов и образование нейтрофило-тромбоцитарных агрегатов исследовались методом проточной цитометрии. Образование тромбов и подвижность гранулоцитов в области тромба оценивались методом флуоресцентной микроскопии в проточных камерах, покрытых коллагеном первого типа (рис.2).



Рис.1. Принцип измерения агрегации тромбоцитов методом световой оптической агрегометрии.

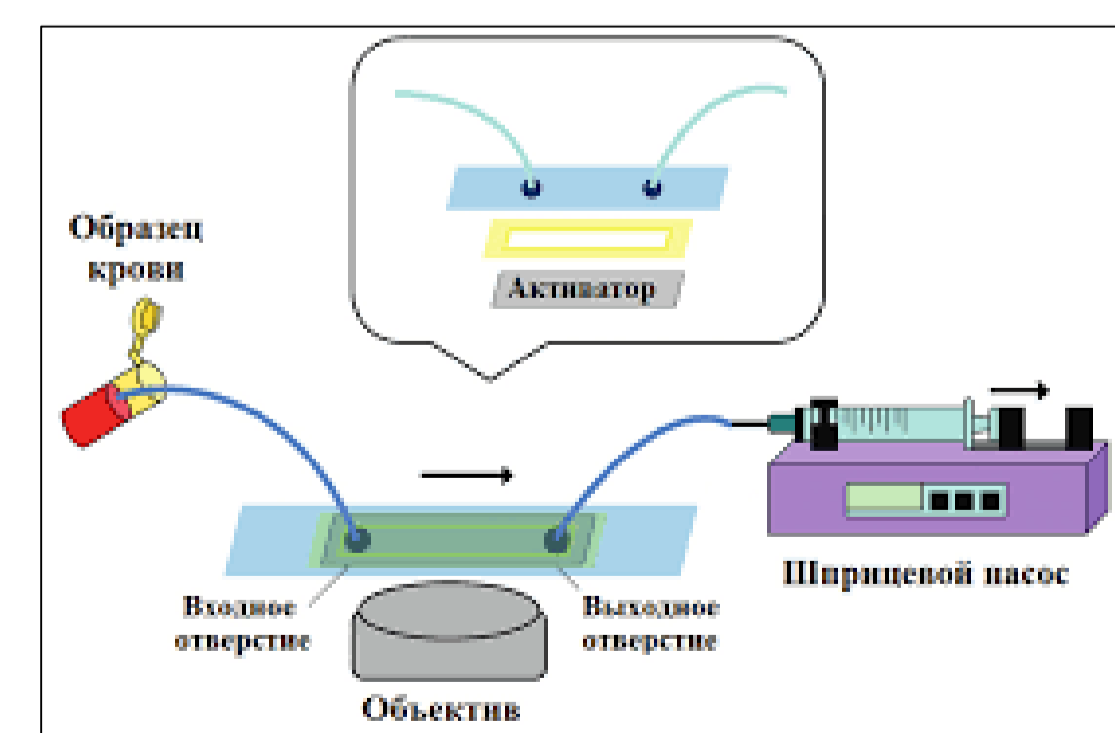


Рис.2. Установка проточной камеры, имитирующей течение крови по поврежденному сосуду.

Заключение

Не обнаружено прямого влияния *B. miyamotoi* на функциональную активность тромбоцитов. При этом *B. miyamotoi* активируют нейтрофилы *in vitro* и *ex vivo*. Добавление *B. miyamotoi* приводит к увеличению площади тромбов, выращенных из цельной крови *ex vivo*.

Нейтрофило-тромбоцитарные агрегаты. При инкубации выделенных нейтрофилов с бактериями *B. miyamotoi* наблюдалось значимое увеличение экспрессии CD11b (показатель активации нейтрофилов) (рис.4А), а при добавлении *B. miyamotoi* в суспензию тромбоцитов наблюдалось увеличение числа событий, связавших антитела к тромбоцитам (Anti-CD42b) и к гранулоцитам (Anti-CD66) – образование нейтрофило-тромбоцитарных агрегатов (рис.4Б).

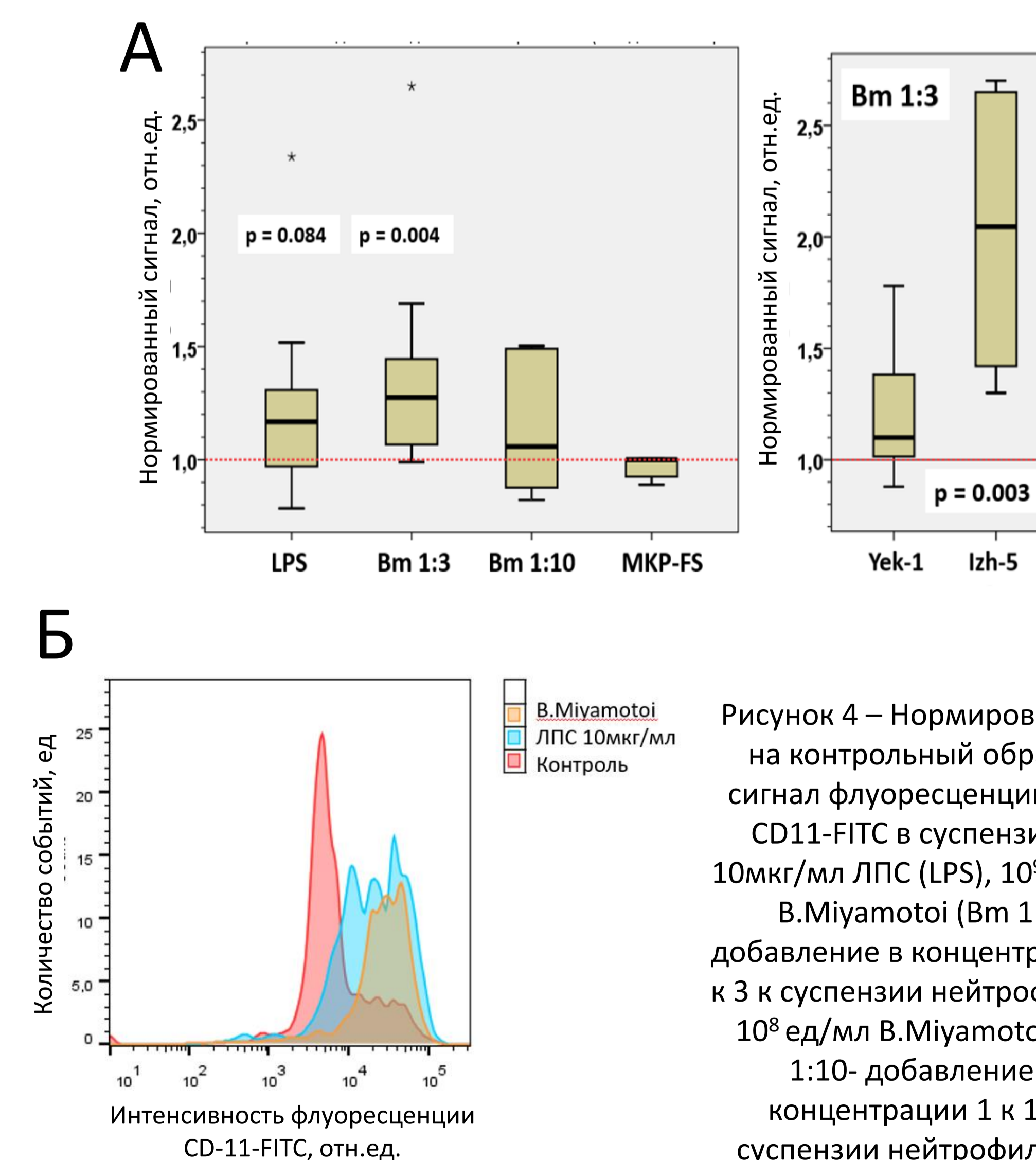


Рисунок 4 – Нормированный на контрольный образец сигнал флуоресценции anti-CD11-FITC в суспензиях с 10мкг/мл ЛПС (LPS), 10^9 ед/мл *B. miyamotoi* (Bm 1:3- добавление в концентрации 1 к 3 к суспензии нейтрофилов), 10^8 ед/мл *B. miyamotoi* (Bm 1:10- добавление в концентрации 1 к 10 к суспензии нейтрофилов) и среды без бактерий (MKP-FS).

Результаты

Агрегометрия. Инкубация цельной крови, богатой тромбоцитами плазмы или суспензии тромбоцитов с *B. miyamotoi* не вызвала агрегацию тромбоцитов, не влияла на степень агрегации, вызываемой стандартными активаторами (АДФ, тромбин) (рис.3). Также не было значительных различий в параметрах агрегации тромбоцитов (максимальная агрегация, скорость ответа, обратимость) между PRP или отмытыми от плазмы тромбоцитами, инкубированными с *B. miyamotoi*, по сравнению с контролем.

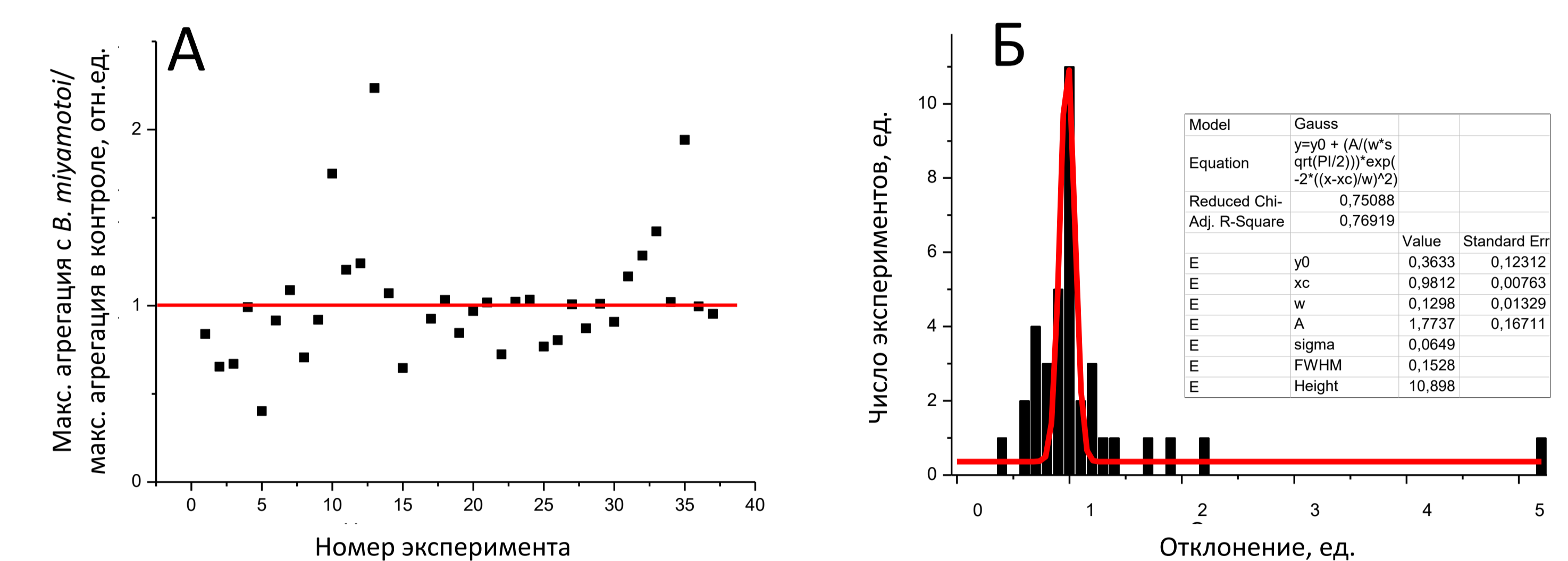


Рис. 3. *B. miyamotoi* не влияют на агрегацию тромбоцитов. (А) Значение максимального пика агрегации для суспензии тромбоцитов, инкубированных с бактериями, нормированное на контрольное значение. (Б) Значение максимального пика агрегации для суспензии тромбоцитов, преинкубированных с бактериями, нормированное на контрольное значение, описывается нормальным распределением.

Образование тромбов. Инкубация цельной крови с добавлением гепарина с *B. miyamotoi* приводила к увеличению площади образующихся в проточных камерах на коллагене тромбов и увеличению количества наблюдаемых в области тромба гранулоцитов (рис.5,6).

Рис. 5. Типичные снимки агрегатов спирохет в экспериментальной установке "тромб в потоке". Зеленый цвет - флуоресценция DIOC-6 в ЭПР тромбоцитов и лейкоцитов. Красным цветом флуоресцируют PS+, сильно активированные тромбоциты по связыванию аннексин-V-Alexa647. Синий цвет - агрегаты спирохет *B. miyamotoi*.

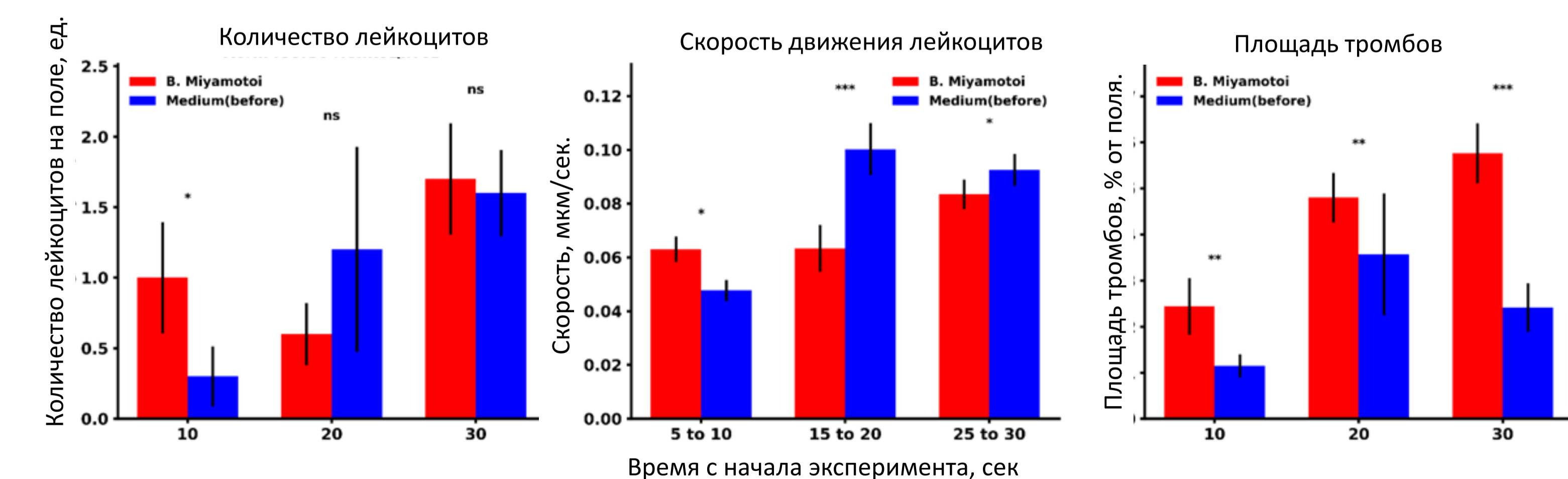
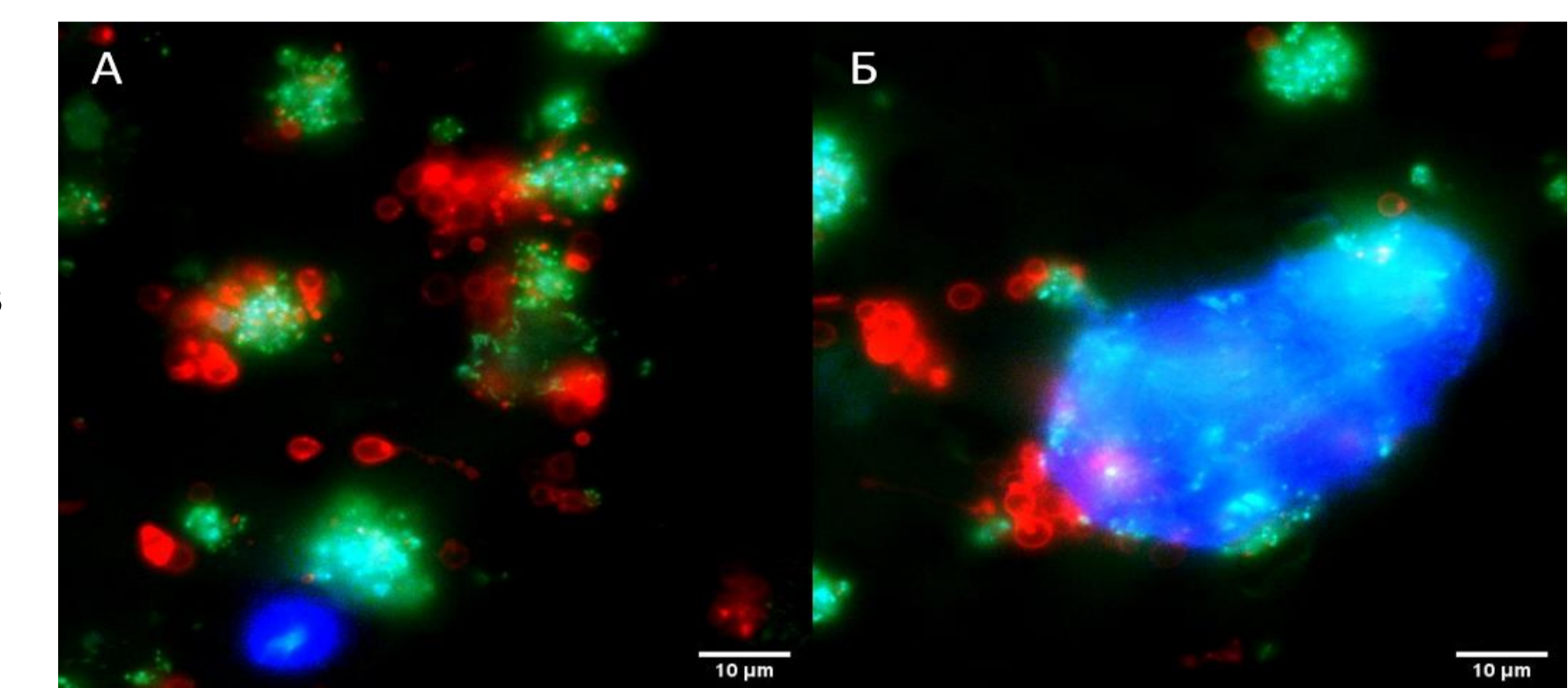


Рис. 6 – Основные наблюдаемые характеристики (площадь тромбов, количество гранулоцитов) повышены в образцах крови, преинкубированной с *B. miyamotoi* более 30 минут.