

13 (22)



Результаты изучения взаимосвязи между интратекальным гуморальным иммунным ответом и содержанием сифилис-ассоциированных антител в системном кровотоке при сифилитической инфекции

Title	Н.К. Левчик, М.В. Пономарева, Н.В. Зильберберг
Authors	ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт дерматовенерологии и иммунопатологии» Минздрава России, Екатеринбург
State	Левчик Н.К., заведующий клиническим научным отделом сифилидологии и ИППП, ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт дерматовенерологии и иммунопатологии» Минздрава России, Екатеринбург Пономарева М.В., младший научный сотрудник экспериментально-лабораторного отдела ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт дерматовенерологии и иммунопатологии» Минздрава России, Екатеринбург Зильберберг Н.В., заместитель директора по научной работе ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт дерматовенерологии и иммунопатологии» Минздрава России, Екатеринбург Левчик Надежда Константиновна 620076, Екатеринбург, ул. Щербакова, 8 Тел.: (343) 218-34-17, 8-904-54-083-25 E-mail: nklevchik@gmail.com

Работа выполнена в экспериментально-лабораторном отделе и клиническом научном отделе сифилидологии и ИППП ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт дерматовенерологии и иммунопатологии» Минздрава России, Екатеринбург

Введение

Одним из наиболее частых и серьезных осложнений сифилиса является вовлечение в инфекционный процесс центральной нервной системы (ЦНС).

Резюме. Целью настоящего исследования являлось изучение взаимосвязи между фактом наличия, активностью и интенсивностью интратекального синтеза иммуноглобулинов (ИГ) и содержанием сифилис-ассоциированных антител в системном кровотоке у серопозитивных по сифилису пациентов. Были исследованы парные образцы сыворотка крови / цереброспинальная жидкость у 126 пациентов, подвергшихся диагностической люмбальной пункции. Интратекальный синтез иммуноглобулинов оценивался с использованием гиперболических формул Райбера. Содержание сифилис-ассоциированных антител в системном кровотоке оценивалось с применением количественных модификаций реакции гемагглютинации (антитрепонемные антитела) и реакции микропреципитации (реагиновые антитела). Пациенты с доказанной интратекальной продукцией иммуноглобулинов имели более высокое содержание антитрепонемных и реагиновых антител в крови. Степень повышения зависела от активности воспалительного процесса в ЦНС и интенсивности интратекального синтеза иммуноглобулинов класса G. Взаимосвязи были более выражены в отношении антитрепонемных, чем реагиновых антител. Таким образом, в настоящем исследовании было установлено наличие связи между интратекальным гуморальным иммунным ответом и содержанием сифилис-ассоциированных антител в системном кровотоке у серопозитивных по сифилису пациентов.

Ключевые слова: сифилис; интратекальный синтез иммуноглобулинов; цереброспинальная жидкость; кровь; антитела

Внедрение бледной трепонемы в ЦНС связано с процессом гематогенной диссеминации возбудителя. Свойства данного микроорганизма таковы, что позволяют ему свободно напрямую проникать через эндотелий сосудов (перфорируя стенку) в любые ткани и органы, в том числе и в ЦНС [1]. Удельный вес нейроинвазии при сифилисе составляет от 30 до 100% всех случаев по данным разных авторов [2].

Антителообразование составляет неотъемлемую часть иммунного ответа против возбудителя



Summary: The goal of our study was to investigate the relationships between the fact of the presence, activity and intensity of intrathecal immunoglobulin synthesis and syphilis antibody level in the bloodstream in patients with serological evidence of syphilis. We analyzed 126 matched serum/CSF pairs from patients that were undergoing lumbar puncture. We used the Reiber's hyperbolic formula to evaluate intrathecal immunoglobulin synthesis and the quantitative serum haemagglutination and flocculation tests to evaluate antitreponemal and reagin antibody level. Patients with evidence of intrathecal immunoglobulin production had more high level of antitreponemal and reagin antibodies in the blood. The degree of increase depended on the activity of the inflammatory process in the central nervous system and the intensity of intrathecal synthesis of immunoglobulin G class. The relationships were more pronounced with respect to antitreponemal than reagin antibodies. Overall, status of the humoral immune response within the central nervous system is reflected at the level of specific antibodies in the systemic circulation in patients with syphilis.

Keywords: syphilis; intrathecal immunoglobulin synthesis; cerebrospinal fluid; blood; antibodies

сифилиса, так как *Treponema pallidum* является внеклеточным паразитом. Особые анатомо-физиологические свойства ЦНС предотвращают развитие выраженного воспалительного ответа в ответ на инфекцию, однако, есть данные, свидетельствующие о том, что ее потенциал в отношении развития гуморальных иммунных реакций сохранен [3]. Следовательно, можно предположить, что синтез иммуноглобулинов интрацеребрально (то есть внутри забарьерного пространства ЦНС) должен происходить во всех случаях нейроинвазии у иммунокомпетентных больных сифилисом.

Именно доказательство интрацеребрального происхождения специфических антител цереброспинальной жидкости лежит в основе лабораторного подтверждения диагноза нейросифилиса. Интрацеребральный синтез иммуноглобулинов лабораторно подтверждается в большинстве случаев

нейросифилиса [4]. Есть работы, доказывающие, что антитела к *Treponema pallidum* являются основным компонентом олигоклональных иммуноглобулинов цереброспинальной жидкости у больных нейросифилисом, что подтверждает специфичность интрацеребрального синтеза иммуноглобулинов [5,6].

Также опубликованы научные данные, свидетельствующие о том, что у пациентов с установленным нейросифилисом чаще выявляются высокие титры реактивных антител, чем у пациентов с неподтвержденным диагнозом, и аналогичная тенденция наблюдается в отношении антитрепонемных антител [7–10]. Для других нейроиноктозий также продемонстрирована связь с высокими титрами специфических антител в крови [11]. Однако остаются неясными иммунобиологические механизмы наблюдаемой закономерности, отсутствуют работы, исследующие взаимоотношения между системным и интрацеребральным антителообразованием. Целью настоящего исследования являлось изучение взаимосвязи между фактом наличия, активностью и интенсивностью интрацеребрального синтеза иммуноглобулинов (ИТС) и содержанием сифилис-ассоциированных антител в системном кровотоке у серопозитивных по сифилису пациентов.

Материал и методы исследования

Материалом для исследования послужили лабораторные данные 126 серопозитивных по сифилису пациентов, подвергшихся люмбальной пункции в отделении венерологии клиники УрНИИДВиИ за период с мая 2006 по ноябрь 2011 года. Все пациенты были осмотрены венерологом и неврологом и подписали информированное согласие.

Образец периферической крови пациента получали в день выполнения люмбальной пункции. Часть пробы цереброспинальной жидкости и крови использовалась для проведения стандартных диагностических исследований, остатки аликвотировались и хранились при -80°C до момента исследования.

Количественное содержание общих иммуноглобулинов изучалось с применением иммуноферментного анализа, альбумина — турбидиметрическим методом.

Интрацеребральный синтез иммуноглобулинов устанавливался с использованием гиперболических формул Райбера и иммуноглобулиновых коэффициентов [12].



Абсолютные и относительные величины минимальной интраклеточно-синтезируемой фракции, а также число одновременно синтезируемых изо-типов использовались для характеристики интенсивности ИТС.

Сочетание ИТС с дисфункцией гематоликторного барьера и/или плеоцитозом расценивалось как признаки активности ИТС [13]. Функциональное состояние гематоликторного барьера оценивалось с использованием альбуминового коэффициента. Наличие плеоцитоза констатировалось при концентрации мононуклеаров в цереброспинальной жидкости выше чем 5 клеток на мм³.

Содержание сифилис-ассоциированных антител в системном кровотоке оценивалось с применением количественных модификаций реакции гемагглютинации (антитрепонемные антитела) и реакции микропреципитации (реагиновые антитела).

По результатам оценки ИТС пациенты были разделены на 3 группы:

- отсутствие лабораторных признаков ИТС (71 человек);
- наличие лабораторных признаков ИТС, отсутствие признаков активности (29 человек);
- наличие лабораторных признаков ИТС и признаков активности воспалительного процесса (26 человек).

В табл. 1 показано распределение между группами различных категорий пациентов. Представлены данные по наличию у пациентов клинической симптоматики, специфической терапии в анамнезе, а также установлению/исключению диагноза «нейросифилис».

Статистический анализ данных проведен с использованием лицензионной программы MedCalc 12.2 (MedCalc Software bvba, Бельгия).

Таблица 1

Удельный вес пациентов различных категорий в исследуемых группах

Категория	Нет признаков интраклеточно-го синтеза Ig, n = 71 (100%)	Есть признаки интраклеточного синтеза Ig		
		всего, n = 55 (100%)	признаки активности*	
			нет, n = 29 (100%)	есть, n = 26 (100%)
	абс. (%)	абс. (%)	абс. (%)	абс. (%)
Наличие неврологических и/или психиатрических симптомов	40 (56%)	45 (82%)	24 (83%)	21 (81%)
Отсутствие специфической терапии в анамнезе	7 (10%)	16 (29%)	2 (7%)	14 (54%)
Специфическая терапия в анамнезе до включения в исследование	63 (89%)	25 (45%)	15 (52%)	10 (38%)
Контроль лечения нейросифилиса (6 месяцев – 5 лет)	1 (1%)	14 (25%)	12 (41%)	2 (8%)
Диагноз «нейросифилис» установлен	5 (7%)	36 (65%)	12 (41%)	24 (92%)
Диагноз «нейросифилис» не подтвержден	65 (92%)	5 (9%)	5 (17%)	0 (0%)

* – цитоз > 5 клеток/мкл и/или альбуминовый коэффициент выше возрастной нормы.

Для выявления межгрупповых различий использовали критерий χ^2 и тест Краскела – Уоллеса. Корреляционные взаимоотношения изучали с применением рангового коэффициента Спирмена. Для всех статистических критериев ошибка первого рода устанавливалась равной 0,05. Нулевая гипотеза (отсутствие различий) отвергалась, если вероятность (p) не превышала ошибку первого рода.

Результаты исследования

В табл. 2 представлены показатели, характеризующие содержание антитрепонемных и реагиновых

антител в крови пациентов каждой из исследуемых групп. Сравнительный анализ выявил достоверные отличия уровня антител в зависимости наличия/отсутствия и активности процесса интраклеточной гуморальной реакции.

Титры антитрепонемных антител в реакции гемагглютинации были существенно ниже в группе пациентов, у которых лабораторные признаки ИТС не были выявлены. Значения титров у них варьировались в пределах от 1:80 до 1:81920, с медианой (межквартильным диапазоном), равной 1:2560 (1:640 – 1:5120). Лабораторно доказанное наличие ИТС было ассоциировано с более высоким



Таблица 2

Содержание антитрепонемных и реактивных антител в крови пациентов в зависимости от факта наличия и активности процесса интратекального синтеза иммуноглобулинов

Тесты		Пациенты с серологическим доказательством сифилиса				Межгрупповое сравнение
		Признаки интратекального синтеза Ig			есть	
		нет, n = 71	признаки активности			
			нет, n = 29	есть, n = 26		
		(1)	(2)	(3)		
РПГА	Отрицательные результаты	Абс. (%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0,63 $p_1 = 0,73$
	Положительные результаты	Абс. (%)	71 (100%)	29 (100%)	26 (100%)	
	Титр	Медиана	1:2560	1:20480	1:163840	61,7 $p_2 < 0,001$
		25-75 процентиль	1:640 – 1:5120	1:10240 – 1:40960	1:20480 – 1:327680	
		Минимум	1:80	1:2560	1:640	
Максимум		1:81920	1:327680	1:1310720		
Различия, $p < 0,05$	(2) (3)	(1) (3)	(1) (2)			
РМП	Отрицательные результаты	Абс. (%)	15 (21%)	0 (0%)	0 (0%)	13,1 $p_1 = 0,001$
	Положительные результаты	Абс. (%)	56 (79%)	29 (100%)	26 (100%)	
	Титр	Различия, $p < 0,05$	(2) (3)	(1)	(1)	36,5 $p_2 = 0,001$
		Медиана	1:4	1:8	1:32	
		25-75 процентиль	1:2 – 1:8	1:4 – 1:8	1:16 – 1:64	
		Минимум	ц	1:2	1:4	
		Максимум	1:32	1:128	1:512	
Различия, $p < 0,05$	(2) (3)	(1) (3)	(1) (2)			

1 χ^2 -тест df_2 .

2 Краскела – Уоллеса тест df_2 .

содержанием антитрепонемных антител, при этом титры антител были значительно выше, если признаки ИТС сочетались с признаками активности воспалительного процесса. Так, в группе с «неактивным» ИТС титр (медиана и межквартильный диапазон) был равен 1:20480 (1:10240 – 1:40960) с размахом от 1:2560 до 1:327680, тогда как в группе с «активным» ИТС значение титра составило 1:163840 (1:20480 – 1:327680) с размахом от 1:640 до 1:1310720.

Подобные закономерности отмечались и в отношении реактивных антител, хотя были менее ярко выражены. Статистически более низкий уровень реактивных антител наблюдался в группе без признаков ИТС. В данной группе примерно у каждого пятого пациента результаты реакции микропреципитации были отрицательными, в случае выявления присутствия антител, титр (медиана и межквартильный диапазон) равнялся 1:4 (1:2 – 1:8), значения

варьировали от минимально выраженной реакции (преципитация с цельной сывороткой) до титра 1:32. «Неактивный» ИТС сочетался с более высокими титрами; медиана (межквартильный диапазон) равнялась 1:8 (1:4 – 1:8) с размахом от 1:2 до 1:128, и еще более высокие титры наблюдались у пациентов с признаками «активного» ИТС, медиана (межквартильный диапазон) была равна 1:32 (1:16 – 1:64), значения варьировали от 1:4 до 1:512.

В табл. 3 представлены данные по анализу корреляции между количественным содержанием антител в системном кровотоке и интенсивностью ИТС, характеризуемой через абсолютные и относительные величины минимальных интратекально-синтезируемых фракций иммуноглобулинов и число одновременно синтезируемых изотипов иммуноглобулинов. Данные корреляционные взаимоотношения были более выражены в отношении антитрепонемных антител. Наблюдалась статистически

Таблица 3

Данные корреляционного анализа между количественным содержанием антител в системном кровотоке и интенсивностью интрацеллюлярного синтеза

Тесты		Показатели, характеризующие интрацеллюлярный синтез иммуноглобулинов								Число изотипов Ig
		минимальная интрацеллюлярно-синтезируемая фракция Ig								
		абсолютная (мг/л)				относительная (%)				
		IgA	IgM	IgG	Ig(A+M+G)	IgA	IgM	IgG	Ig(A+M+G)	
РПГА	r_s			0,51	0,54			0,37	0,43	0,44
	p	0,26	0,8	< 0,001	< 0,001	0,9	0,75	0,016	0,003	0,001
РМП	r_s			0,42	0,36			0,33	0,27	
	p	0,2	0,22	0,005	0,014	0,8	0,6	0,029	0,063	0,48

r_s — коэффициент корреляции Спирмена.

значимая прямая умеренная корреляция между титром реакции гемагглютинации и величинами минимальной интрацеллюлярно-синтезируемой суммарной фракции иммуноглобулинов (A+M+G) и фракции класса G (как в абсолютном, так и в относительном выражении), а также числом одновременно синтезируемых изотипов иммуноглобулинов. Титры реагиновых антител в реакции микропреципитации умеренно коррелировали только с абсолютными значениями минимально интрацеллюлярно-синтезируемой суммарной фракции иммуноглобулинов (A+M+G) и фракции класса G.

Обсуждение полученных результатов

Таким образом, в настоящем исследовании было установлено наличие связи между интрацеллюлярным гуморальным иммунным ответом и содержанием сифилис-ассоциированных антител в системном кровотоке у серопозитивных по сифилису пациентов. Пациенты с доказанной интрацеллюлярной продукцией иммуноглобулинов имели более высокий уровень антитрепонемных и реагиновых антител в крови, и степень повышения зависела от активности воспалительного процесса в ЦНС и интенсивности интрацеллюлярного синтеза IgG. Указанные взаимосвязи были более выражены в отношении антитрепонемных, чем реагиновых антител.

Установленная статистическая взаимосвязь между интрацеллюлярным и системным антителообразованием может быть обусловлена следующими механизмами.

Иммунопривилегированность ЦНС благоприятствует сохранению микроорганизмов на ее территории, и поэтому можно предположить, что в случае нейроинвазии создаются условия для более выраженной и длительной антигенной стимуляции и, как следствие, большей численности специфических В-клеток памяти. Кроме того, эктопическая

лимфоидная ткань ЦНС может быть дополнительным источником антител, так как интрацеллюлярно синтезированные иммуноглобулины также поступают в системный кровоток. Однако их доля в общем пуле антител может быть незначительна в сравнении с вкладом других лимфоидных образований [14]. Также нельзя исключить возможность, что выраженный гуморальный иммунный ответ является отражением большей инфекционной дозы и/или длительности присутствия возбудителя в системном кровотоке и лимфоците, что определяет большую вероятность нейроинвазии. Требуется дальнейшее исследование, проясняющее природу выявленной взаимосвязи.

Некоторые особенности выявленных взаимосвязей представляются биологически правдоподобными. Доминирующим классом синтезируемых иммуноглобулинов является класс G, доля классов M и A в общем пуле на порядок меньше. Поэтому кажется логичным, что значимые корреляционные связи установлены только с минимальной интрацеллюлярно-синтезируемой фракцией иммуноглобулинов данного класса. Иммунный ответ против чужеродных белков является более сильным, облигатным и долговременным в сравнении с таковым против липидных антигенов, поэтому количество синтезируемых антитрепонемных антител значительно выше, чем реагиновых. Данное обстоятельство может являться объяснением того, что статистические взаимосвязи более выражены по отношению к антитрепонемным антителам, чем к реагиновым.

В результате проведенного исследования получены данные, углубляющие понимание связи между системными и интрацеллюлярными иммунными реакциями при сифилисе, и свидетельствующие о параллелизме протекающих процессов. Детальное изучение зависимостей может стать базисом для разработки лабораторных инструментов своевременного выявления нейросифилиса.



Литература

1. Thomas D.D. Interactions of *Treponema pallidum* with endothelial cell monolayers / D.D. Thomas, A.M. Fogelman, J.N. Miller, M.A. Lovett // *Eur. J. Epidemiol.* — 1989. — №5. — P. 15–21.
2. Ghanem K.G. Neurosyphilis: A historical perspective and review / K.G. Ghanem // *CNS Neurosci Ther.* — 2010. — Vol. 16, No. 5. — P. 157–168.
3. Knopf P.M. Antigen-dependent intrathecal antibody synthesis in the normal rat brain: tissue entry and local retention of antigen-specific B cells / P.M. Knopf, C.J. [et al.] // *J. Immunol.* — 1998. — Vol. 161, No. 2. — P. 692–701.
4. Hische E. Cerebrospinal fluid IgG and IgM indexes as indicators of active neurosyphilis / E. Hische, J. Tutuarima, E. Wolters [et al.] // *Clin. Chem.* — 1988. — Vol. 34, No. 4. — P. 665–667.
5. Vartal F. Neurosyphilis: intrathecal synthesis of oligoclonal antibodies to *Treponema pallidum* / F. Vartal, B. Vandvik, T.E. Michaelsen [et al.] // *Ann Neurol.* — 1982. — No. 11. — P. 35–40.
6. Pedersen N.S. Specificity of immunoglobulins synthesized within the central nervous system in neurosyphilis / N.S. Pedersen, S. Kam-Hansen, H. Link, M. Mavra // *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand C.* — 1982. — Vol. 90, No. 2. — P. 97–104.
7. Робустов Г.В. Сифилис нервной системы // Венерические болезни: руководство для врачей. Под ред.: М.П. Демьяновича, Н.М. Туранова. — М.: Медгиз, 1956. — С. 128–162.
8. Marra C.M. Cerebrospinal fluid abnormalities in patients with syphilis: association with clinical and laboratory features / C.M. Marra [et al.] // *The Journal of Infectious Diseases.* — 2004. — No. 189. — P. 369–376.
9. Wohrl S. Neurosyphilis is unlikely in patients with late latent syphilis and a negative blood VDRL test / S. Wohrl, A. Geusau // *Acta Derm Venereol.* — 2006. — No. 86. — P. 335–339.
10. De Silva Y. The value of serum TPHA titres in selecting patients for lumbar puncture / Y. de Silva, M. Walzman, M. Shahmanesh // *Genitourin Med.* — 1991. — Vol. 67, No. 1. — P. 37–40.
11. Borges A.S. Evaluation of intrathecal synthesis of specific IgG antibodies against *Toxoplasma gondii* in the diagnosis assessment of presumptive toxoplasma encephalitis in AIDS patients / A.S. Borges, J.F. Figueiredo // *Rev Soc Bras Med Trop.* — 2004. — Vol. 37, No. 6. — P. 480–484.
12. Reiber H. Reporting cerebrospinal fluid data: knowledge base and interpretation software / H. Reiber, M. Otto, C. Trendelenburg, A. Wormek // *Clin Chem Lab Med.* — 2001. — № 39. — P. 324–332.
13. Reiber H. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs / H. Reiber, J.B. Peter // *J. Neurol. Sci.* — 2001. — Vol. 184, No. 2. — P. 101–122.
14. Reiber H. Protein in cerebrospinal fluid and blood: barriers, CSF flow rate and source-related dynamics / H. Reiber // *Restorative Neurology and Neuroscience.* — 2003. — No. 21. — P. 79–96.