

ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЕ КЛЕТОК КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С СЕРОРЕЗИСТЕНТНЫМ, РАННИМ И ПОЗДНИМ СКРЫТЫМ СИФИЛИСОМ

Барычева Л.Ю., Минасян М.М., Чеботарев В.В., Одинец А.В.

ГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ставрополь, e-mail: for_ludmila@inbox.ru

В последние годы большое внимание уделяется изучению врожденного и адаптивного иммунитета в развитии сифилиса. Показано, что изменения иммунного статуса могут привести к диссеминации бледной трепонемы с формированием вторичных форм и серорезистентности. Цель исследования: анализ показателей иммунофенотипирования клеток крови и сывороточных иммуноглобулинов у пациентов с серорезистентным, ранним и поздним скрытым сифилисом. Обследовано 100 человек с сифилитической инфекцией: 41 пациент с серорезистентным сифилисом, 35 – с ранним скрытым сифилисом, 24 – с поздним скрытым сифилисом. Установлено, что у пациентов с серорезистентным, ранним и поздним скрытым сифилисом отмечается перераспределение состава иммунокомпетентных клеток с увеличением количества цитотоксических/эффекторов. Признаки дефицита Т-клеточного звена иммунитета определяются преимущественно у пациентов с серорезистентным сифилисом в виде уменьшения количества Т-хелперов, НК-клеток.

Ключевые слова: серорезистентный сифилис, ранний скрытый сифилис, поздний скрытый сифилис, иммунный статус.

IMMUNOPHENOTYPIZATION OF BLOOD CELLS AT PATIENTS WITH SERUM RESISTANT, EARLY AND LATER LATENT SYPHILIS

Barycheva L.Yu., Minasyan M.M., Chebotarev V.V., Odinets A.V.

GBO VO «Stavropol state medicaluniversity» Health Ministry of Russian Federation, Stavropol, e-mail: for_ludmila@inbox.ru

In recent years, much attention has been paid to the study of congenital and adaptive immunity in the development of syphilis. It is shown that changes in the immune status can lead to dissemination of pale treponema with the formation of secondary forms and serum resistance. The purpose of the study: the analysis of immunophenotyping parameters of blood cells and serum immunoglobulins at patients with serous, early and late latent syphilis. 100 people with syphilitic infection were examined: 41 patients with serous resistant syphilis, 35 with early latent syphilis, 24 with late latent syphilis. It was found that at patients with serum resistant, early and late latent syphilis, a redistribution of the composition of immunocompetent cells was observed with an increase in the number of cytotoxic / effector. Symptoms of deficiency of the T-cell link of immunity are determined predominantly at patients with serum resistant syphilis in the form of a decrease in the number of T-helper cells, NK cells.

Keywords: serum resistant syphilis, early latent syphilis, late latent syphilis, immune status.

Сифилис – одно из самых распространенных венерических заболеваний на планете. По данным Всемирной Организации Здравоохранения ежегодно в мире регистрируется не менее 12–15 миллионов новых случаев сифилитической инфекции [1]. В последние десятилетия отмечается структурное перераспределение клинических форм заболевания с распространением эпидемиологически неблагоприятных ранних скрытых форм сифилиса, а также поздних скрытых форм с развитием висцерального и нейросифилиса [2, 3]. Несмотря на успехи современной венерологии, у 2–20 % больных после лечения наблюдается развитие серорезистентности [2, 3, 4].

За последние три десятилетия появились доказательства определяющей роли врожденного и адаптивного иммунитета в развитии сифилиса [5-9]. Показано, что

характерной чертой персистирующего течения заболевания является формирование динамического равновесия между бледной трепонемой и иммунной системой «хозяина», изменения в котором могут привести к диссеминации *T. Pallidum* с формированием вторичных форм и серорезистентности [8, 9].

Цель исследования: анализ показателей иммунофенотипирования клеток крови и сывороточных иммуноглобулинов у пациентов с серорезистентным, ранним и поздним скрытым сифилисом.

Материал и методы исследования. В работе представлены данные, полученные при иммунологическом обследовании 100 больных сифилитической инфекцией, находившихся под наблюдением в Краевом клиническом кожно-венерологическом диспансере. В группу I вошли 35 пациентов с ранним скрытым сифилисом, в группу II – 24 пациента с поздним скрытым сифилисом, в группу III – 41 пациент с серорезистентным сифилисом. Контрольную группу составили 50 здоровых респондентов, сопоставимых по возрасту и полу.

Для обеспечения репрезентативности полученных результатов из исследования были исключены ВИЧ-инфицированные пациенты, больные сахарным диабетом, аутоиммунными, аллергическими и онкологическими заболеваниями.

Имунофенотипирование лимфоцитов осуществляли методом проточной цитометрии с использованием одно- и двухпараметрических реагентов линии IQTest: CD19-PC5, HLA-DR-PC5, CD3-FITC/CD4-PE, CD8-PC5, CD3-FITC/CD (16+56)-PE, CD45-ECD фирмы Beckman Coulter, США на лазерном проточном цитометре Cytomicx FC 500 фирмы Beckman Coulter, США.

Общее количество лейкоцитов, относительное и абсолютное содержание субпопуляций лимфоцитов определяли с использованием одноплатформенной технологии с помощью гетерогенного гейтирования по панлейкоцитарному маркеру CD45⁺ и показателям светорассеяния с применением калибровочных частиц Flow-Count Fluorospheres фирмы Beckman Coulter, США.

Определение иммуноглобулинов А, G, М в сыворотке крови выполняли методом количественной иммунотурбодиметрии с помощью биохимического анализатора AU 680 500 фирмы Beckman Coulter, США. Для анализа использовали реактивы фирмы Beckman Coulter, США. Оценку внутриклеточного кислородзависимого метаболизма нейтрофилов крови проводили с помощью НСТ-теста в модификации А.Н. Маянского и М.Е. Виксмана (1979). Фагоцитарную активность нейтрофилов и моноцитов крови исследовали на модели поглощения частиц латекса (Фрейдлин И.С., 1986).

Для статистического анализа данных использовали пакет программ «Primer of Biostat 4,0», Attestat 10.5.1.». Количественные значения с распределением, отличным от нормального, представляли в виде медианы и интерквартильного (25 и 75 процентиля) размаха (Me (Q1-Q)).

Для оценки межгрупповых различий применяли однофакторный дисперсионный анализ, критерии Ньюмена – Кейлса, Данна. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Показатели фагоцитоза и оксидазной активности нейтрофильных гранулоцитов у пациентов с сифилисом не отличались от здоровых респондентов (таблица).

Показатели иммунного статуса у пациентов с сифилисом

| Показатель | Ранний скрытый сифилис (I) (n=35) | Поздний скрытый сифилис (II) (n=24) | Серо-резистентный сифилис (III) (n=41) | Контрольная группа (IV) (n=50) | P |
|--|-----------------------------------|-------------------------------------|--|--------------------------------|---|
| Лейкоциты | 7,7 (7,0-8,4) | 7,6 (6,7-8,5) | 6,9 (6,4-7,5) | 7,0 (6,6-7,3) | |
| Лимфоциты | 26,8 (25,1-28,4)* | 27,7 (25,9-29,5)* | 28,4 (26,4-30,4)* | 31,1 (29,2-32,9) | |
| Фагоцитоз, % | 69,7 (64,9-74,6) | 70,8 (64,7-77,3) | 69,8 (66,1-73,5) | 73,1 (1,2-74,9) | |
| НСТ сп., % | 5,1 (3,4-6,8) | 5,8 (3,5-8,1) | 6,4 (5,1-7,7) | 5,4 (4,8-6,0) | |
| ИС НСТ | 3,5 (2,6-4,5) | 3,4 (2,4-4,0) | 2,4 (2,1-2,7) | 2,9 (2,8-3,0) | |
| CD3 ⁺ , % | 73,1 (70,3-75,8) | 69,2 (65,6-72,7) | 71,5 (68,1-74,9) | 72,3 (70,7-73,8) | |
| CD3 ⁺ , *10 ⁹ /л | 1,58 (1,40-1,76) | 1,66 (1,45-1,86) | 1,35 (1,20-1,49)* | 1,62 (1,50-1,73) | |
| CD4 ⁺ , % | 45,1 (43,7-46,5) | 44,6 (42,0-47,2) | 43,6 (44,1-46,1) | 45,8 (44,2-47,4) | |
| CD4 ⁺ , *10 ⁹ /л | 1,10 (0,81-1,32) | 1,15 (0,86-1,44) | 0,81 (0,72-0,90)* | 1,03 (0,96-1,11) | p _{I-III} <0,05 p _{II-III} <0,05 |
| CD8 ⁺ , % | 27,0 (23,8-30,3)* | 27,9 (23,8-31,9)* | 26,7 (23,8-29,5)* | 22,7 (21,3-24,2) | |
| CD8 ⁺ , *10 ⁹ /л | 0,56 (0,45-0,66) | 0,62 (0,50-0,74) | 0,52 (0,45-0,59) | 0,50 (0,44-0,57) | |
| HLADR ⁺ , % | 21,2 (18,5-23,9)* | 19,2 (16,2-22,3)* | 18,9 (15,7-22,1)* | 3,81 (3,57-4,06) | |
| HLADR ⁺ , *10 ⁹ /л | 0,41 (0,36-0,47)* | 0,40 (0,32-0,48)* | 0,42 (0,33-0,51)* | 0,11 (0,07-0,15) | |
| CD16 ⁺ , % | 13,8 (11,7-16,0) | 14,1 (11,2-16,9) | 11,5 (9,3-13,6)* | 14,1 (12,7-15,5) | |
| CD16 ⁺ , *10 ⁹ /л | 0,30 (0,22-0,37) | 0,26 (0,20-0,32) | 0,25 (0,19-0,31) | 0,31 (0,28-0,35) | |
| CD19 ⁺ , % | 13,5 (11,0-15,9) | 14,9 (11,7-18,1) | 12,1 (10,4-13,7) | 12,0 (11,2-12,8) | |
| CD19 ⁺ , *10 ⁹ /л | 0,27 (0,21-0,33) | 0,29 (0,22-0,35) | 0,23 (0,19-0,27) | 0,26 (0,24-0,28) | |
| IgM, г/л | 1,53 (1,25-1,82) | 1,82 (1,53-2,10)* | 1,24 (1,07-1,41) | 1,35 (1,21-1,49) | |
| IgG, г/л | 11,7 (11,2-12,2) | 12,3 (11,7-13,0) | 11,8 (10,8-12,9) | 11,9 (11,3-12,4) | |
| IgA, г/л | 2,87 (2,54-3,20)* | 2,7 (2,3-3,2)* | 2,57 (2,31-2,84)* | 1,35 (1,21-1,49) | |

Примечание: *- $p < 0,05$ – по сравнению с контрольной группой, $p_{I-II}, p_{I-III}, p_{II-III}$ – достоверность межгрупповых различий (критерий Ньюмена – Кейлса, критерий Данна), n – число пациентов.

У больных всех клинических групп отмечалось снижение относительного содержания лимфоцитов, что согласуется с данными, представленными в литературе.

Содержание Т-лимфоцитов и Т-хелперов при раннем и позднем скрытом сифилисе не отличалось от аналогичных показателей у здоровых доноров (таблица).

У пациентов всех групп установлено увеличение средних показателей HLADR⁺ Т-лимфоцитов (таблица, рис. 1а, 1б).

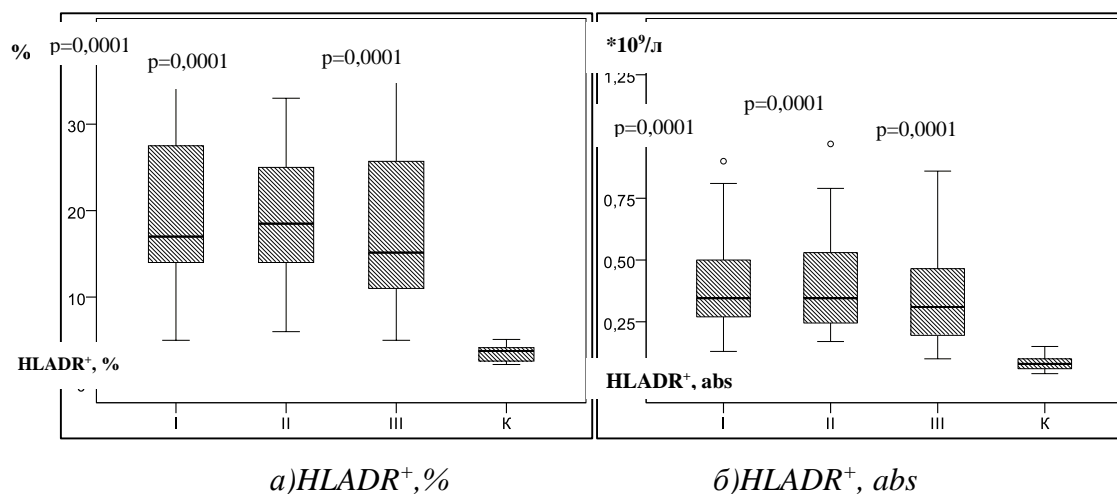


Рис. 1. Содержание HLADR⁺-лимфоцитов у пациентов с сифилисом

Примечание: р – достоверные отличия по сравнению с контрольной группой; К – контрольная группа, I – ранний скрытый сифилис II – поздний скрытый сифилис, III – серорезистентный сифилис (критерий Ньюмена – Кейлса, критерий Данна).

В группе с серорезистентным сифилисом определялось снижение абсолютного содержания CD3⁺- и CD4⁺-клеток по сравнению со здоровыми людьми. Установлены достоверные различия абсолютных показателей CD4⁺-лимфоцитов при серорезистентном сифилисе по сравнению с ранним и поздним скрытым сифилисом (таблица, рис. 2б).

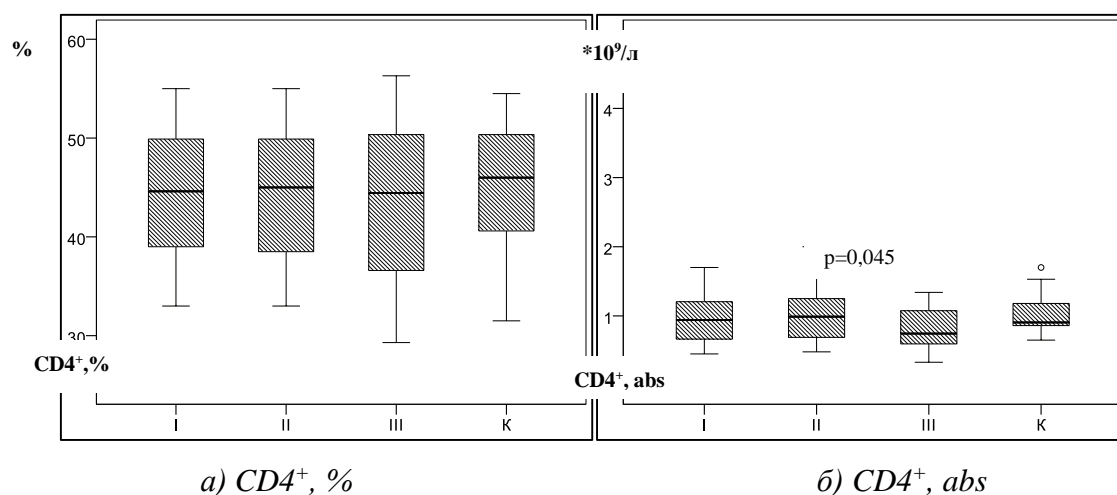


Рис. 2. Содержание CD4⁺-лимфоцитов у пациентов с сифилисом

Примечание: р – достоверные отличия по сравнению с контрольной группой; К – контрольная группа, I – ранний скрытый сифилис II – поздний скрытый сифилис, III – серорезистентный сифилис (критерий Ньюмена-Кейлса, критерий Данна).

Развитие серорезистентности при сифилисе нередко связано с изменением баланса CD4⁺/CD8⁺-лимфоцитов [6]. Низкие показатели CD3⁺- и CD4⁺-лимфоцитов у пациентов с серорезистентностью подтверждаются ранее проведенными исследованиями [7, 10]. Содержание и функциональная активность Т-хелперов (CD4⁺) имеет ключевое значение в развитии реакций гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) и может рассматриваться

в качестве одного из факторов, способствующих формированию серорезистентности [6]. Известно, что отсутствие негативации комплекса серологических реакций с высокой частотой отмечается у ВИЧ-инфицированных и иммунокомпрометированных больных сифилисом, что сопровождается ухудшением течения заболевания и отрицательно влияет на результаты лечения [8]. Вероятно, снижение количества CD4⁺-лимфоцитов у пациентов с серорезистентным сифилисом может быть связано с недостаточным синтезом IL2 и IL12 мононуклеарами периферической крови [6].

Существует мнение, что дефицит Th1 при вторичном сифилисе обусловлен высоким уровнем апоптоза периферических лимфоцитов посредством активации Fas-опосредованного пути, что затрудняет санацию организма и создает предпосылки для хронизации инфекции [7]. Кроме того, установлено снижение функциональных показателей Th1 по сравнению со здоровыми респондентами [6].

При оценке субпопуляций Т-лимфоцитов нами выявлено увеличение относительного содержания CD8⁺-лимфоцитов у пациентов всех групп (таблица, рис.3а).

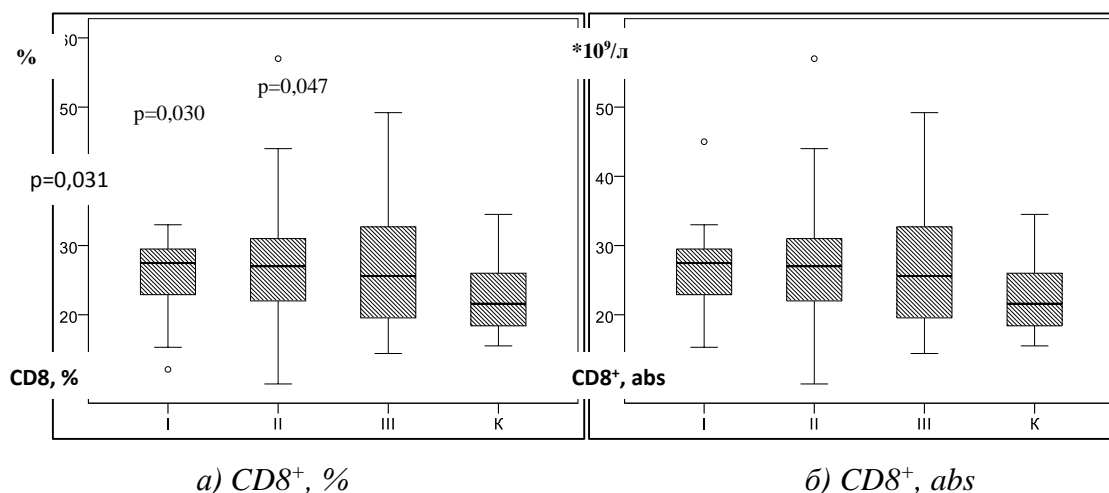


Рис. 3. Содержание CD8⁺-лимфоцитов у пациентов с сифилисом

Примечание: р – достоверные отличия по сравнению с контрольной группой (критерий Ньюмена – Кейлса, критерий Данна); К – контрольная группа, I – ранний скрытый сифилис, II – поздний скрытый сифилис, III – серорезистентный сифилис.

Роль Т-цитотоксических/эффекторов в клиренсе бледных трепонем до конца не определена. По мнению ряда авторов их увеличение может отражать динамику иммунного ответа, направленного на элиминацию внутриклеточного патогена и имеет компенсаторный характер [6, 11, 12].

В случае экспериментальной инфекции ранее было показано, что появление CD8⁺ - клеток в месте внедрения *T. Pallidum* регистрируется уже на 11–18 день после заражения, при этом их преобладание над CD4⁺-клетками отмечается в период разрешения процесса

между 25 и 39 днем [13]. Установлено, что сифилитические инфильтраты при твердом шанкре у пациентов с сифилисом содержат преимущественно Т-хелперы, в то время как Т-цитотоксические/эфффекторы преобладают при вторичных сифилитических поражениях [13]. Вероятно, активированные CD8⁺-лимфоциты могут вносить свой вклад в увеличение IF γ , необходимого для активации макрофагов и реализации ГЗТ или лизировать эпителиальные клетки, инфицированные *T. Pallidum*, что подтверждается присутствием матричной РНК перфорина и гранзима [9].

Вместе с тем существует мнение, что активация CD8⁺-лимфоцитов при сифилисе подавляет реакцию ГЗТ и синтез опсонизирующих антител [9], имеющих определяющее значение в клиренсе *T. Pallidum*.

При иммунофенотипировании клеток крови у пациентов с серорезистентным сифилисом нами выявлено статистически достоверное уменьшение количества НК-клеток (таблица).

Известно, что НК-клетки играют основную роль в иммунном ответе на внутриклеточные патогены, способствуя синтезу IFN γ , поляризации Т-лимфоцитов и созреванию дендритных клеток. Натуральные киллеры являются основным источником IFN γ при стимуляции мононуклеаров периферической крови липопротеинами *T. Pallidum* [11], что согласуется с существующими в литературе сведениями об уменьшении активности НК-клеток при развитии сифилиса [9, 12].

В исследованиях последних лет у пациентов с вторичной сифилитической инфекцией выявлено появление нетипичной популяции циркулирующих НК (CD56⁺CD16⁺) с низким потенциалом секреции IF γ и других интерлейкинов [9].

При оценке сывороточных иммуноглобулинов нами зарегистрировано увеличение уровня IgM у пациентов с поздним скрытым сифилисом и повышение значений IgA у больных всех групп без достоверных межгрупповых различий. Высокие концентрации сывороточных иммуноглобулинов при сифилисе получены в ряде исследований ранее и, вероятно, обусловлены продолжительной антигенной стимуляцией в условиях активной персистенции *T. Pallidum* [9, 14].

Таким образом, при иммунофенотипировании клеток крови у пациентов с серорезистентным, ранним и поздним скрытым сифилисом отмечается перераспределение состава иммунокомпетентных клеток с увеличением количества Т-цитотоксических/эфффекторов. Увеличение количества активированных лимфоцитов свидетельствует об активации иммунного ответа в условиях персистенции *T. Pallidum*.

Признаки дефицита Т-клеточного звена иммунитета определяются преимущественно у пациентов с серорезистентным сифилисом в виде уменьшения количества Т-хелперов, НК-

клеток. Полученные данные целесообразно использовать при интерпретации результатов серологических исследований у пациентов с сифилисом и для прогнозирования различных форм заболевания.

Список литературы

1. Newman L., Kamb M., Hawkes S., Gomez G, Say L., Seuc A., Broutet N. Global estimates of syphilis in pregnancy and associated adverse outcomes: analysis of multinational antenatal surveillance. *PLoS Med.*, 10(2): e1001396. Published: February 26, 2013. ULR: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001396>.
2. Чеботарев В.В., Чеботарева Н.В., Асхаков М.С. Сифилис: была ли предсказуема ситуация? / В.В. Чеботарев, Н.В. Чеботарева, М.С. Асхаков // *Medicus*. – 2015. – № 1. – С.12-14.
3. Современные представления о серологической резистентности при сифилисе (обзор литературы) / Г.М. Бондаренко [и др.] // *Дерматология та венерология*. – 2015. – № 4. – С.5-16.
4. Кытманова Л.Ю., Москвичева М.Г., Радзиховская М.В. Сравнительный анализ динамики эпидемического процесса при сифилисе, ВИЧ-инфекции и гепатитах В и С / Л.Ю. Кытманова, М.Г. Москвичева, М.В. Радзиховская // *Южно-Уральский медицинский журнал*. – 2014. – № 3. – С.7-11.
5. Современные представления об иммунных изменениях при сифилисе / В.И. Прохоренков [и др.] // *Сибирское медицинское обозрение*. – 2014. – № 4. – С.20-27.
6. Qin J., Yang T., Wang H., Feng T., Liu X. Potential Predictors for Serofast State after Treatment among HIV-Negative Persons with Syphilis in China: A Systematic Review and Meta-Analysis // *Iran J. Public Health*. 2015. Vol. 44, № 2. P. 155-169.
7. Salazar J.C., Cruz A.R., Pope C.D., Valderrama L., Trujillo R., Saravia N.G., Radolf J.D. *Treponema pallidum* Elicits Innate and Adaptive Cellular Immune Responses in Skin and Blood during Secondary Syphilis: A Flow-Cytometric Analysis // *J. Infect Dis*. 2007. Vol. 195. № 6. P. 879-887.
8. Li J., Zheng He-Yi. Characteristics of Patients with Primary and Late Latent Syphilis Patients Who Were Initially Non-Reactive to the Rapid Plasma Reagin Test // *Jpn. J. Infect. Dis*. 2013. Vol. 66. P. 36-40.
9. Cruz A.R., Ramirez L.G., Zuluaga A.V., Pillay A., Abreu C., Valencia C.A., La Vake C., Cervantes J.L., Dunham-Ems S., Cartun R., Mavilio D., Radolf J.D., Salazar J.C. Immune Evasion and Recognition of the Syphilis Spirochete in Blood and Skin of Secondary Syphilis Patients: Two

Immunologically Distinct Compartments. Published: July 17, 2012;
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001717>.

10. Новгородова Т.И. Особенности цитокинового профиля и функционального состояния эндотелия у больных нейросифилисом: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Екатеринбург, 2013. – 24 с.
11. Bao T.Y., Yu N.S., Zeng K., Li L., Fang L. Cellular immunity in patients with seroresistance of syphilis // *Practical Preventive Medicine(China)*. 2006. Vol. 13. № 2. P. 254–256.
12. Zhang C.Y. Clinical analysis of serofast patients among syphilitic patients // *Lab. Med.Clin.(China)*. 2013. Vol. 10. № 7. P. 887– 888.
13. Charmie B.T., Godornes C., Van Voorhis W.C., Ukehart S.A., CD4⁺Lymphocytes and Gamma Interferon Predominate in Local Immune Responses in Early Experimental Syphilis. *Infect. Immun.* 2007. Vol. 75, № 6. P. 3021-3026.
14. Спиридонов В.Е., Майстренок А.М. Особенности эпидемиологической ситуации по сифилису в Витебской области / В.Е. Спиридонов, А.М. Майстренок // *Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации: материалы 72-ой научной сессии сотрудников университета*. – Витебск: Изд-во Витебского гос. мед. ун-та, 2017. – С.77-78.