

УДК. 616-092:612.017.1.577.114:616-018.2-002.77

DOI: 10.14427/jipai.2016.3.90

Антиэндотоксиновый иммунный ответ и его взаимосвязи с показателями общего иммунитета и воспаления у больных системной красной волчанкой I и II степени активности

Д.В. Шадуро, В.А. Белоглазов, А.И. Гордиенко

Медицинская академия им. С.И. Георгиевского (структурное подразделение) ФГАОУ ВО "Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского", г.Симферополь, Республика Крым, РФ

Antiendotoxin immune response and its relationship to the total immunity and inflammation in patients with systemic lupus erythematosus I and II degree of activity

D.V. Shaduro, V.A. Beloglazov, A.I. Gordienko

Medical Academy named after S.I. Georgievsky of "Crimean Federal University named after V.I. Vernadsky", Simferopol, Republic of Crimea, Russia

Аннотация

Цель данного исследования заключалась в изучении взаимосвязей клеточного и гуморального антиэндотоксинового иммунного ответа и показателей общего иммунитета и системного воспаления у больных системной красной волчанкой (СКВ) различной степенью активности.

Материалы и методы. Исследуемую группу составили 48 больных СКВ (I степень - 27, II- 21), контрольную группу - 40 относительно здоровых донора. Дизайн исследования заключался в определении уровня и количества основных субпопуляций лимфоцитов (CD3+, CD19+, CD4+, CD8+, CD3+ HLADR, CD3+/16+/56+, CD3-/16+/56+), экспрессии рецепторов CD14 и LPS-FITC, фагоцитарной активности нейтрофилов, концентрации общих иммуноглобулинов и специфических антиэндотоксиновых антител класса А, М и G, ЦИК, С-реактивного белка, эндогенной интоксикации. В исследовании использовались методы проточной лазерной цитофлуориметрии, спектрофотометрии, твердофазного иммуноферментного анализа.

Результаты. У больных СКВ выявлена дисфункция как гуморального, так и клеточного антиэндотоксинового иммунного ответа в виде снижения экспрессии CD14 и LPS-FITC рецепторов (на 25% и 14% соответственно) и резком увеличении антиэндотоксиновых антител класса G (более чем в 2 раза). Наличие выявленных изменений усиливается с ростом активности заболевания. Обнаруженные корреляционные связи между антиэндотоксиновым иммунным ответом и общим иммунным статусом, а также с показателями системного воспаления подтверждают тесную взаимосвязь и влияние напряженности данного типа иммунного ответа и системного воспаления, при этом наиболее выраженные связи были обнаружены у пациентов с низкой степенью активности СКВ.

Выводы: Наличие выявленной дисфункции антиэндо-

Summary

The aim of this study was to investigate the influence and correlation of cellular and humoral antiendotoxin immune response to common immunity and systemic inflammation indicators in systemic lupus erythematosus (SLE) patients with different degrees of activity.

Materials and methods. The studied group consisted of 48 patients with SLE (I degree - 27, II- 21), control group - 40 relatively healthy donor. Design of the study was to determine the level and amount of major subpopulations of lymphocytes (CD3+, CD19+, CD4+, CD8+, CD3+ HLADR, CD3+ / 16+ / 56+, CD3-/16+ 56+), expression of receptors CD14 and LPS-FITC, phagocytic activity of neutrophils, the overall concentration of immunoglobulins and specific anti-endotoxin antibody class A, M and the G, circulating immune complexes, C-reactive protein, endogenous intoxication. A study was performed by flow laser cytometry, spectrophotometry, ELISA.

Results. SLE patients revealed dysfunction of both humoral and cellular immune response antiendotoxin in reduction of expression of CD14 and LPS-FITC receptors (25% and 14%, respectively) and sharp increase in anti-endotoxin class G antibodies (more than 2 fold). Revealed changes grow up with increasing of disease activity. The observed correlations between endotoxin immune response and the overall immune status, as well as with systemic inflammation indicators confirm the close relationship and the impact intensity of this type of immune response and systemic inflammation, in fact, the most pronounced relations were found in patients with a low degree of SLE activity.

Conclusions. The presence of the identified antiendotoxin immune response dysfunction is amplified with an increase in disease activity, reflecting the persistent influence of LPS on cellular LPS-binding system in SLE patients.

токсинового иммунного ответа усиливается с ростом активности заболевания, что отражает персистентное влияние ЛПС на клеточные ЛПС-связывающие системы у больных СКВ.

Ключевые слова

Системная красная волчанка, антиэндотоксиновый иммунный ответ, липополисахарид, иммунный статус.

Keywords

Systemic lupus erythematosus, immune response to endotoxin, lipopolysaccharide, immune status.

Введение

Системная красная волчанка (СКВ) является тяжелым диффузным аутоиммунным заболеванием соединительной ткани, неизвестной этиологии и сложным патогенезом развития и прогрессирования. В настоящее время доказано, что СКВ характеризуется дисфункцией Т-клеточного звена иммунитета и клеток моноцитарного ряда, поликлональной активацией В-лимфоцитов, с последующей гиперпродукцией органоспецифических антител и аутоантител (анти-ДНК, анти- Sm, RNP, Ro-SSA, La-SSB) [1, 2], с последующим образованием циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК). При этом клинические проявления зависят, как от прямого поражения аутоантителами и активации системы комплемента, так и от отложения ЦИК на базальной мембране клеток органов и сосудов.

Теоретически и практически важным представляется поиск интегральных факторов индукции и самоподдержания аутоиммунного воспаления при СКВ для разработки современных подходов к таргетной терапии этого заболевания. Потенциально, роль такого интегрального фактора может играть липополисахарид (ЛПС) или эндотоксин (ЭТ) грамотрицательных бактерий. Известно, что ЭТ способен приводить к поликлональной активации В-лимфоцитов, активировать систему комплемента, индуцировать выработку целого ряда провоспалительных цитокинов, усиливать антителогенез [3,4]. Исходя из вышесказанного, механизмы влияния ЭТ на иммунную систему человека - полностью совпадают с иммунопатогенезом СКВ [5]. Вместе с тем, результирующий эффект воздействия ЛПС на эффекторные системы организма во многом определяется состоянием специфических ЭТ-связывающих механизмов, среди которых выделяют антительные (специфические антитела различных классов) и клеточные (рецепторы к ЭТ на поверхности клеток) и неантительные (липополисахаридсвязывающий белок, С-реактивный белок и др.) [6-8]. Данные о комплексном изучении состоянии ЭТ связывающих систем при СКВ во

взаимосвязи с показателями иммунной реактивности и системного воспаления представляют научный и практический интерес.

Цель. Целью исследования явилось изучение взаимосвязей клеточного и гуморального антиэндотоксинового иммунного ответа и показателей общего иммунитета и системного воспаления у больных различной степенью активности СКВ.

Материалы и методы

Объектом данного исследования были выбраны больные системной красной волчанкой, находящиеся на стационарном лечении в ревматологическом отделении КРУ КТМО "Университетская клиника им. Н.А. Семашко", а также добровольные доноры. В исследование было включено 48 пациентов с диагнозом СКВ. Верификация диагноза проводилась в соответствии с Федеральными клиническими рекомендациями по диагностике и лечению системной красной волчанки [9]. Критериями включения пациентов послужили: верифицированный диагноз, хроническое течение СКВ, отсутствие хронических вирусных инфекций (вирусных гепатитов, ВИЧ), отсутствие острых вирусных инфекций на момент исследования, отсутствие острой и хронической органической патологии желудочно-кишечного тракта, не связанного с проявлениями СКВ, добровольное согласие пациентов на включение в исследование. Контрольную группу составили 40 относительно здоровых донора, соответствующие I и II группе здоровья по классификации ВОЗ (2001 г.), добровольно участвующие в данном исследовании.

Для выполнения поставленной цели и задач, исследуемые были разделены на 3 группы: больные СКВ I степенью активности процесса (27 человек), больные СКВ II степенью активности процесса (21 человек), и лица контрольной группы (40 человек). Для распределения больных по степени активности СКВ использовали фундаментальную классификацию данного заболевания, в соответствии с выраженностью симптоматики и уровню лабораторных показате-

лей, разработанную академиком В.А. Насоновой (1972 г.) [10], с последующей ревалидизацией по индексу оценки общей активности заболевания - SLEDAI [11]. В ходе распределения исследуемых по гендерному признаку, в группе I-ой степени активности женщины составили 92,6% (25 пациентов), мужчины соответственно 7,4% (2 пациента), во II-ой степени - женщины составили 85,7% (18 пациентов), мужчины - 14,3% (3 пациента), в контрольной группе - женщины составили 80% (32 донора), мужчины - 20% (8 донора). Средний возраст пациентов I-ой группы составил $34,6 \pm 2,6$ года, II-ой группы - $38,6 \pm 2,2$ года, контрольной группы - $30 \pm 2,7$ года. Пациенты I группы находились на глюкокортикостероидной (ГКС) терапии метилпреднизолоном в средней суточной дозировке $8,6 \pm 1,4$ мг, трое пациентов (11,1%) - не принимали гормональные препараты на момент исследования. Средне суточная дозировка метилпреднизолона у пациентов II группы составила $15,3 \pm 1,6$ мг.

Материалом исследования послужила цельная венозная кровь и ее сыворотка пациентов и доноров, в образцах которой изучали параметры клеточного и гуморального антиэндотоксического иммунного ответа (АЭТИО), общего иммунного и врожденного иммунитета, а так же уровни С-реактивного белка (СРБ) и эндогенной интоксикации (ЭИ).

Для изучения клеточного АЭТИО изучали уровень экспрессии рецепторов CD14 и эндотоксинсвязывающего потенциала (рецепторов LPS-FITC) на моноцитах и гранулоцитах методом проточной лазерной цитофлуориметрии - PAS III (Partec GmbH, Munster, Germany), используя в качестве флуоресцентного зонда конъюгат липополисахарида и флуоресцеинизотиоцианата [12].

Гуморальное звено АЭТИО определяли по уровню концентрации специфических антител классов А, М и G к ЛПС (соответственно анти-ЛПС-IgA, анти-ЛПС-IgM и анти-ЛПС-IgG) методом твердофазного ИФА с использованием в виде антигена - ЛПС *Escherichia coli* K235 (Sigma Chem. Co., USA).

Определение общего иммунного статуса состояло в изучении уровня субпопуляций лейкоцитов CD3+, CD19+, CD4+, CD8+, CD3+ HLADR, CD3+/16+/56+, CD3-/16+/56+ методом проточной лазерной цитофлуориметрии с использованием флуоресцентных конъюгатов моноклональных антител фирмы "DakoCytomation, Denmark A/S". Фагоцитарную активность гранулоцитов и фагоцитарный индекс определяли при помощи проточной лазерной цитофлуориметрии, ис-

пользуя суспензию бактерий *Escherichia coli* K30 и *Staphylococcus aureus* конъюгированных с флуоресцеинизотиоцианатом (Isomer I, Sigma Chem. Co., USA) Уровни общих иммуноглобулинов IgA, IgM и IgG определяли микротурбодиметрическим исследованием с использованием моноспецифических овечьих сывороток к иммуноглобулинам человека класса А, М и G, полученные в НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.И. Гамалеи (г. Москва, РФ), и стандартную сыворотку крови человека (С1 К95) из набора для определения иммуноглобулинов методом Манчини (НИИ эпидемиология и микробиология, г. Горький, РФ). Циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) изучали спектрофотометрическим методом при помощи преципитации в 4,2% растворе полиэтиленгликоля.

Концентрацию СРБ определяли методом твердофазного ИФА с использованием биотинилированных антител к СРБ и конъюгата стрептавидин-пероксидазы (Sigma Chem. Co., USA).

Уровень эндогенной интоксикации (ЭИ) изучали спектрофотометрическим методом по спектру поглощения очищенных от белков фракций сыворотки крови в ультрафиолете при длине волны 260 и 280 нм, определяя при этом концентрацию молекул средней массы.

Для сбора и анализа результатов использовали программное обеспечение Partec FloMax V.2.4d, а также WinMDI 2.8 (Joseph Trotter, Scripps Institute, La Jolla, CA). Статистическую оценку данных изучали при помощи лицензионной программы Microsoft Office Excel 2007 и MedStat (№ MS0011 ДНПП ТОВ «Альфа»).

Результаты

При изучении клеточного и гуморального АЭТИО у исследуемых групп нами были получены результаты представленные в таблице 1. Статистически значимые различия при сравнении АЭТИО между I и II степенью СКВ были обнаружены только в уровнях экспрессии LPS-FITC на моноцитах, критерий Стьюдента был установлен на уровне значимости $p=0,003$. При сравнении показателей I и II степени СКВ с донорами, статистически значимые различия были определены между CD14 на моноцитах ($p_{1,2} < 0,001$), CD14 на гранулоцитах (W-критерий Вилкоксона $p_2=0,02$), LPS-FITC на моноцитах ($p_{1,2}=0,001$), LPS-FITC на гранулоцитах ($p_1 < 0,001$, W-критерий Вилкоксона $p_2 < 0,001$), анти-ЛПС-IgG ($p_{1,2} < 0,001$). Статистических различий в уровнях анти-ЛПС-IgA и IgM у больных СКВ с донорами определено не было.

Таблица 1. Средние показатели уровней экспрессии рецепторов CD14, LPS-FITC и антиэндотоксиновых антител классов А, М и G у больных I и II степени СКВ и лиц контрольной группы.

| Показатели (ед.опт.пл.) | I степень СКВ (n=27) | II степень СКВ (n=21) | Контрольная группа (n=40) |
|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| CD14 на моноцитах | 18,8 ± 0,71* | 18,27 ± 0,71* | 24,34 ± 1,12 |
| CD14 на гранулоцитах | 0,72 ± 0,02 | 0,68 ± 0,02* | 0,79 ± 0,03М (0,68; 0,85) |
| LPS-FITC на моноцитах | 1,65 ± 0,07*# | 1,32 ± 0,07*# | 2,02 ± 0,08 |
| LPS-FITC на гранулоцитах | 0,95 ± 0,02* | 0,90 ± 0,03М* (0,87; 0,98) | 1,13 ± 0,03 |
| анти-ЛПС-IgA | 0,19 ± 0,02 | 0,18 ± 0,01 | 0,20 ± 0,03М (0,124; 0,33) |
| анти-ЛПС-IgM | 0,17 ± 0,04М (0,091; 0,34) | 0,15 ± 0,03М (0,08; 0,221) | 0,28 ± 0,03 |
| анти-ЛПС-IgG | 0,70 ± 0,05* | 0,80 ± 0,07* | 0,30 ± 0,07М (0,16; 0,61) |

Примечание: М - медиана и ошибка медианы, (I-квартиль; III - квартал); * - статистическая значимость на уровне ($p \leq 0,05$) между группами сравнения и контролем; # - статистическая значимость на уровне ($p \leq 0,05$) между группами I и II степени СКВ.

Данные изучения общего иммунного статуса и показателей системного воспаления у больных СКВ представлены в таблице 2. При статистическом изучении полученных данных различий между I и II степенью СКВ не были выявлены. Статистические различия были выявлены при сравнении I степени активности заболевания с контрольной группой, а именно в уровнях CD3+, CD19+, CD8+, ЦИК, СРБ, фагоцитарной активности и числа, индекса эндогенной интоксикации. А так же при сравнении II степени активности СКВ с донорами: CD3+, CD8+, CD3+ HLADR, CD3-/16+56+, общего IgG, ЦИК, СРБ, фагоцитарной активности и числа, индекса эндогенной интоксикации (ЭИ).

Статистически значимые изменения иммунологических показателей выраженные в процентах от контрольной группы, принятой за норму (изолиния) представлены на рисунке 1. При этом наиболее сильные изменения наблюдались в увеличении концентрации анти-ЛПС-IgG, увеличении количества CD8+ лимфоцитов и снижении фагоцитарного числа.

Следующим этапом исследования стало изучение корреляционных связей между полученными результатами. Результаты представлены в таблице 3. При этом нами обнаружены прямые и обратные умеренные ($0,3 \geq R < 0,5$) и заметные ($0,5 \geq R < 0,7$) корреляционные связи (коэффициент Спирмена и Пирсона).

Обсуждение

Как видно из полученных данных (Рис. 1.), у больных СКВ наблюдается значимое снижение экспрессии на моноцитах и гранулоцитах как CD14 рецепторов (до 25% ниже нормы), так и LPS-FITC (до 14% ниже нормы). С увеличением степени активности СКВ усиливается снижение данных ЛПС связывающих рецепторов (на 2% и 14%, $p_1=0,001$, $p_2<0,001$ соответственно). Как известно, уровень экспрессии CD14 рецепторов увеличивается в острый период инфекционной (в том числе ЛПС) интоксикации организма [13], но затем, в ходе хронического избыточного ЛПС-стимула, по законам взаимодействия рецептор-лиганд (закон обратного взаимодействия), может приводить к снижению активных рецепторных структур экспрессируемых на клеточной поверхности. LPS-FITC объединяет различные рецепторы обладающие свойством распознавать и связывать ЛПС. Прогностически уровень экспрессии ЛПС рецепторов свидетельствует о функциональном состоянии клеток иммунной системы в борьбе с эндотоксином. Есть данные, что уровень рецепторов снижается в условиях их функциональной блокировки избытком эндотоксина, а так же при снижении их экспрессии в ответ на хронический избыточный эндотоксиновый стимул [14]. По мнению Carey L. Shive и соавт. [15] снижению уровня экспрессии CD14 рецепторов, может способствовать активация

Таблица 2. Средние уровни показателей общего иммунного статуса и системного воспаления у больных I и II степени СКВ и лиц контрольной группы.

| Показатель | I степень СКВ (n=27) | II степень СКВ (n=21) | Контрольная группа (n=40) | Статистическая значимость |
|-----------------------------|--|---|---|--|
| CD 3+ (%) | 73,31 ± 1,19 | 72,36 ± 2,02 ^M (70,13; 77,62) | 63,17 ± 1,81 | p ₁ <0,001 p ₂ =0,002 |
| CD19+ (%) | 3,73 ± 0,55 ^M (2,66; 5,72) | 4,89 ± 1,05 ^M (3,54; 5,99) | 5,81 ± 0,3 | p ₁ =0,001 p ₂ =0,205 |
| CD4+ (%) | 39,43 ± 1,89 | 39,72 ± 2,20 | 36,06 ± 1,48 | p ₁ =0,160 p ₂ =0,164 |
| CD8+ (%) | 34,34 ± 2,32 | 36,16 ± 2,83 | 23,26 ± 1,42 | p _{1,2} <0,001 |
| CD3+ HLADR (%) | 0,28 ± 0,04 ^M (0,21; 0,38) | 0,31 ± 0,07 ^M (0,26; 0,45) | 0,25 ± 0,02 | p ₁ =0,143 p ₂ =0,010 |
| CD3+/16+/56+ (%) | 0,51 ± 0,03 | 0,50 ± 0,03 | 0,48 ± 0,06 | p ₁ =0,691 p ₂ =0,743 |
| CD3-/16+56+ (%) | 7,34 ± 1,49 ^M (3,58; 14,77) | 7,26 ± 0,80 | 10,71 ± 0,77 | p ₁ =0,171 p ₂ =0,006 |
| Общий IgA (г/л) | 2,1 ± 0,08 | 1,97 ± 0,09 | 1,96 ± 0,05 | p ₁ =0,121 p ₂ =0,921 |
| Общий IgM (г/л) | 1,87 ± 0,15 ^M (1,65; 2,19) | 1,78 ± 0,12 | 1,83 ± 0,05 | p ₁ =0,166 p ₂ =0,751 |
| Общий IgG (г/л) | 11,24 ± 0,23 | 11,48 ± 0,25 | 10,77 ± 0,2 | p ₁ =0,138 p ₂ =0,036 |
| ЦИК (усл.ед.) | 17,73 ± 2,4 ^M (13,23; 26,87) | 13,23 ± 3,24 ^M (12,9; 22,3) | 12,67 ± 1,12 | p ₁ =0,005 p ₂ =0,046 |
| Фагоцитоз (%) | 12,81 ± 0,92 | 12,09 ± 0,91 | 33,05 ± 2,14 | p _{1,2} <0,001 |
| Фагоцитарное число | 5,87 ± 0,19 | 5,66 ± 0,23 | 7,69 ± 0,3 | p _{1,2} <0,001 |
| СРБ (мкг/мг) | 13,23 ± 6,33 ^M (8,82; 28,3) | 19,33 ± 5,95 ^M (8,95; 34,28) | 2,44 ± 0,3 | p _{1,2} <0,001 |
| ЭИ при 260 нм (ед. опт.пл.) | 0,06 ± 0,005 ^M (0,05; 0,086) | 0,07 ± 0,004 | 0,07 ± 0,02 | p ₁ =0,066 p ₂ =0,67 |
| ЭИ при 280 нм (ед. опт.пл.) | 0,12 ± 0,01 ^M (0,11; 0,13) | 0,13 ± 0,011 ^M (0,114; 0,17) | 0,12 ± 0,006 ^M (0,11; 0,14) | p ₁ =0,734 p ₂ =0,225 |
| Индекс ЭИ | 2,05 ± 0,09 | 2,09 ± 0,09 | 1,81 ± 0,05 | p ₁ =0,022 p ₂ =0,013 |

Примечание: М - медиана и ошибка медианы, (I-квартиль; III - квартал), p₁ - статистическая значимость между I степенью СКВ и контрольной группой, p₂ - статистическая значимость между II степенью СКВ и контрольной группой.

различных лигандов толл-лайк рецепторов (TLR) в условиях их стимуляции ЛПС, а так же переход фиксированных CD14 рецепторов в растворимую форму (sCD14). В экспериментах Bosshart H. и Heinzelmann M. [16] было описано, что долгосрочное присутствие ЛПС вызывает изначально рост экспрессии CD14 рецепторов на моноцитах с последующим снижением экспрессии, вплоть до спонтанного исчезновения данных рецепторов. Следует отметить, что в работах Sigifredo Pedraza-Sánchez и соавт. (2013 г.) при изучении

экспрессии CD14 и TLR рецепторов у новорожденных детей, было выявлено естественное снижение данного показателя, что трактуется авторами как защитная реакция организма. Низкая экспрессия TLR4 может сделать новорожденных более восприимчивыми к инфекциям, но, в то же время, защитить их от вредного воздействия подавляющей воспалительной реакции, в условиях их адаптации к новому миру [17]. Как видно из вышеописанных работ, значение данных рецепторов в воспалительных реакциях имеет большее

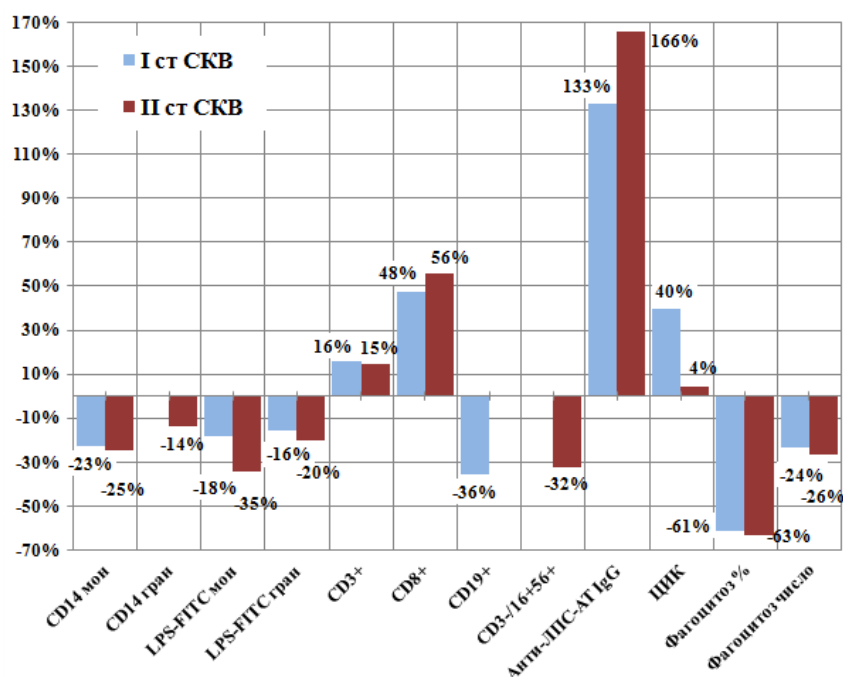


Рис. 1. Процентные изменения иммунологических показателей у больных I и II степени активности СКВ по сравнению с контрольной группой.

Таблица 3. Корреляционные взаимосвязи между показателями антиэндоксинного иммунного ответа и общим иммунитетом у больных СКВ.

| Вариационные ряды | Коэффициент корреляции | Уровень статистической значимости |
|---|------------------------|-----------------------------------|
| CD14 и LPS-FITC на моноцитах | $r_1 = 0,399$ | $p=0,040$ |
| CD14 на моноцитах фагоцитарное число | $r_1 = 0,380$ | $p=0,05$ |
| CD14 на гранулоцитах и LPS-FITC на моноцитах | $r_1 = 0,413$ | $p=0,032$ |
| CD14 на гранулоцитах и общий IgA | $r_{1,2} = -0,482$ | $p=0,027$ |
| CD14 на гранулоцитах и анти-ЛПС-IgM | $r_1 = -0,487$ | $p < 0,01$ |
| LPS-FITC на моноцитах и фагоцитоз % | $r_1 = 0,395$ | $p=0,041$ |
| LPS-FITC на моноцитах и СРБ | $r_1 = -0,429$ | $p=0,03$ |
| LPS-FITC на гранулоцитах и фагоцитоз % | $r_1 = 0,449$ | $p=0,019$ |
| LPS-FITC на гранулоцитах и CD3+/16+/56+ лимфоциты | $r_1 = -0,522$ | $p=0,005$ |
| LPS-FITC на гранулоцитах и ЦИК | $r_2 = 0,483$ | $p=0,03$ |
| Анти-ЛПС-IgA и фагоцитоз % | $r_1 = -0,399$ | $p=0,039$ |
| Анти-ЛПС-IgA и ЭИ при 260 нм | $r_1 = -0,593$ | $p < 0,01$ |
| Анти-ЛПС-IgA и ЭИ при 280 нм | $r_1 = -0,466$ | $p=0,01$ |
| Анти-ЛПС-IgM и CD8+ лимфоциты | $r_1 = -0,422$ | $p=0,03$ |
| Анти-ЛПС-IgM и ЭИ при 260 нм | $r_1 = -0,451$ | $p=0,04$ |
| Анти-ЛПС-IgG и CD3+ HLA DR лимфоциты | $r_1 = 0,649$ | $p < 0,01$ |
| Анти-ЛПС-IgG и СРБ | $r_2 = -0,436$ | $p=0,05$ |

Примечание: R_1 - корреляционная взаимосвязи показателей у больных I степенью СКВ, R_2 - корреляционная взаимосвязи показателей у больных II степенью СКВ.

значение, чем просто ответ на инфекционный агент, а снижение экспрессии рецепторов является механизмом, ассоциируемым с длительным и чрезмерным воздействием ЛПС на клетки моноцитарно-макрофагального ряда.

Учитывая это, можно предположить, что у больных СКВ имеется хроническое влияние ЛПС на организм, что косвенно свидетельствует об усилении транслокации ЛПС из естественного резервуара грамотрицательной кишечной флоры по оси: кишечник > порталный кровоток > системный кровоток.

При исследовании гуморального звена АЭТИО нами было выявлено статистически значимое увеличение концентрации анти-ЛПС-IgG до 166% от нормы, что так же отражает специфический гуморальный ответ на хронический чрезмерный ЭТ-стимул. При этом с увеличением степени активности СКВ, увеличивается и концентрация данных антител, что свидетельствует о его прямой зависимости от активности волчаночного воспаления.

Изменения в иммунном статусе у исследуемых были представлены увеличением количества общих Т-лимфоцитов (CD3+) и цитотоксических лимфоцитов (CD8+) до 15% и 56% соответственно. У больных II степенью активности количество цитотоксических лимфоцитов было выше, чем у больных I степенью на 8%. Нами было выявлено снижение общих В-лимфоцитов (CD19+) на 36% у пациентов I степенью СКВ. Постоянно высокий уровень общих Т-лимфоцитов, по нашему мнению, отражает хроническую персистенцию аутоиммунного воспаления, что имеет место у больных СКВ. Увеличение уровня CD8+ лимфоцитов свидетельствует, вероятно, о напряженности антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности. Снижение количества В-лимфоцитов наиболее выраженное при I степени активности СКВ, свидетельствует о возможном их переходе в плазматические клетки, которые являются основными продуцентами аутоантител. Снижение концентрации данных лимфоцитов можно трактовать и влиянием ЛПС, как стимулятора их поликлональной активации с последующим переходом в плазматические клетки и потерей CD19+ принадлежности [18]. У больных СКВ нами обнаружено снижение уровня натуральных киллеров (CD3-/16+/56+) на 32% у лиц со II степенью активности СКВ по сравнению с контролем, а также выраженное снижение фагоцитарной активности гранулоцитов (в среднем на 62% от нормы) и фагоцитарного числа (на 25%) без существенных межгрупповых отличий. Кро-

ме этого, было выявлено увеличение ЦИК у пациентов I степени активности СКВ по сравнению с донорами (на 40%) и нормализация их уровня у пациентов со II степенью СКВ. Приближение уровня ЦИК к нормативным значениям на фоне дисфункции фагоцитоза у больных II степенью активности СКВ может свидетельствовать об их усиленном отложении (из системного кровотока) на базальные мембраны и эндотелии сосудистой системы, повышая степень активности иммунокомплексной компоненты воспаления.

Для подтверждения теории взаимосвязи и влияния АЭТОИ на иммунный статус и системное воспаление нами были изучены коэффициенты корреляции между изученными показателями. Наличие умеренных прямых связей между уровнем экспрессии рецепторов CD14 и LPS-FITC на моноцитах и гранулоцитах характеризует их тесное взаимодействие и синергичность выполняемых функций. При СКВ выявлены прямые умеренные взаимосвязи между рецепторами к ЛПС и фагоцитарной активностью гранулоцитов. Современные данные подтверждают, что фагоцитарную активность лейкоцитов непосредственно снижают провоспалительные цитокины (IL-8, TNF α , IL-6, IL-1 β) [19], которые являются важным патогенетическим субстратом самоподдержания аутоиммунного воспаления при СКВ. Как известно, данные цитокины выделяются при активации рецепторов CD14 на моноцитах и макрофагах [20]. Так же существуют достоверные сведения о том, что посредством Toll-лайк рецепторов 4 типа (TLR4), ассоциированными с CD14 рецепторами, происходит активация фагоцитоза [21]. Схожая картина дисфункции фагоцитарного звена иммунитета и АЭТИО описанная у больных другим аутоиммунным заболеванием - ревматоидным артритом, получена в исследовании Абрамовой К.В. [22]. Исходя из этого, персистирующее ЛПС воздействие на данные фагоцитарные клетки может приводить, по нашему мнению, к нарушению всех этапов обработки антигенного материала: от поглощения до презентации. Интересным фактом является наличие обратной зависимости между экспрессией LPS-FITC на моноцитах и СРБ, а также отрицательная связь СРБ и Анти-ЛПС-IgG. Данное взаимодействие свидетельствует о протекторном влиянии как клеточного, так и гуморального звена АЭТИО на системное воспаление. При этом нормализация экспрессии LPS-FITC и увеличение специфических антител приводит к снижению лабораторных признаков воспалительного процесса. Так же в пользу протекторного вли-

яния гуморального ответа АЭТИО выступает наличие отрицательных заметных связей между ЛПС антителами иных классов (А и М) с эндогенной интоксикацией.

Особый интерес представляет возможность изменений иммунных показателей у больных СКВ под действием системных глюкокортикоидных препаратов, обладающих выраженным противовоспалительным эффектом. Исходя из полученных данных, в данном исследовании, у больных со II степенью активности волчаночного процесса доза ГКС была на 78% выше, чем у пациентов I степени. При этом 11,1% пациентов I степени вообще не принимали ГКС терапию. Исходя из полученных нами данных, у больных II степенью СКВ сохраняются выраженные иммунопатологические изменения в сравнении с больными I степенью, описанные выше, за исключением уровня субпопуляций CD19+ лимфоцитов и ЦИК. Более низкие показатели CD19+ лимфоцитов и ЦИК у пациентов II группы являются, вероятно, ответом на более высокие дозы системных ГКС, что закономерно приводит к усилению апоптоза лимфоцитов, снижению их активации, торможению образования ЦИК. Хотя по данным литературы наибольший эффект ГКС оказывают на угнетение активации и пролиферации Т-лимфоцитов, синтез IgG. По этому статистически значимое увеличение количества CD3+ и CD8+ лимфоцитов, анти-ЛПС- IgG у пациентов СКВ в нашем исследовании можно объяснить характером иммунопатологических сдвигов при данном заболевании и невозможностью их коррекции монотерапией системными ГКС, а также преобладанием процессов активации вышеуказанных звеньев иммунитета, в том числе и под воздействием чрезмерного ЛПС-стимула.

При изучении литературных источников, был обнаружен ряд научных исследований, где описывалось, что ГКС не имеют прямого влияния на фагоцитарную функцию лейкоцитов [23], в том числе и назначение высоких доз ГКС при пульс-терапии у больных СКВ [24, 25]. В исследовании G. Umberto Meduri и соавт. (2001 г.), было доказано, что метилпреднизолон даже усиливает внутриклеточный килинг и фагоцитарную активность нейтрофилов именно на ЛПС содержащие антигены [26]. В исследованиях Y. You и соавт. [27] было доказано, что метилпреднизолон ингибирует индукцию ЛПС на транскрипционный фактор NF-κB клеток хозяина и положительно влияет на течение люпус нефрита. Вместе с тем, длительное применение системных ГКС у

больных СКВ потенциально может приводить к ослаблению энтерального барьера, препятствующего проникновению внутрикишечных ксенобиотиков во внутренние среды организма, в том числе и ЛПС грамотрицательных бактерий. Поэтому снижение показателей фагоцитарной активности, ЛПС связывающего рецепторного аппарата моно- и гранулоцитов, выявленными нами у больных СКВ, могут отражать интегральный эффект комбинированного воздействия аутоиммунного воспаления, с продукцией антинуклеарных факторов, длительного приема ГКС и хронической эндогенной (в том числе эндотоксиновой) интоксикации.

Выводы

У больных СКВ имеется статистически значимая дисфункция антиэндотоксинового иммунного ответа, выражающаяся в снижении уровня экспрессии CD14 и LPS-FITC и увеличении концентрации ЛПС-антител. Наличие выявленных изменений усиливается с ростом активности заболевания, что отражает персистентное влияние ЛПС на клеточные ЛПС-связывающие системы. Изменения в общем иммунном статусе, а именно увеличение количества цитотоксических лимфоцитов, Т-лимфоцитов, снижение В-лимфоцитов соответствует патогенетической картине СКВ, при этом увеличение уровня цитотоксических лимфоцитов тем сильнее, чем выше степень активности СКВ. Выявленные корреляционные связи между клеточным, гуморальным звеном АЭТИО и общим иммунным статусе, а так же с показателям системного воспаления. А именно прямая значимая зависимость экспрессии CD14 и LPS-FITC и показателей фагоцитарной активности, обратная зависимость между специфическими ЛПС антителами с одной стороны и СРБ и эндогенной активацией с другой, что подтверждает выраженное влияние напряженности гуморального иммунного ответа на ЛПС и системного воспаления. При этом наиболее выраженные связи были обнаружены у пациентов с низкой (I) степенью активности СКВ, что может иметь значение в инициации патогенетических механизмов системного воспаления. Выявленными нами у больных СКВ изменения клеточного и гуморального общего и АЭТИО, могут отражать интегральный эффект комбинированного воздействия аутоиммунного воспаления, с продукцией антинуклеарных факторов, длительного приема ГКС и хронической эндогенной (в т.ч. эндотоксиновой) интоксикации.

Литература

1. Huang J., Song G., Yin Z. [et al.]. Rapid reduction of antibodies and improvement of disease activity by immunoadsorption in Chinese patients with severe systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol.* 2016; 35(9):2211-8. DOI: 10.1007/s10067-016-3354-2.
2. Björkman L., Reich C.F., Pisetsky D.S. The use of fluorometric assays to assess the immune response to DNA in murine systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol.* 2003; 57(6):525-33. DOI: 10.1046/j.1365-3083.2003.01261-x.
3. Dumont N., Aubin E., Proulx D.P. [et al.]. Increased secretion of hyperimmune antibodies following lipopolysaccharide stimulation of CD40-activated human B cells in vitro. *Immunology.* 2009; 126(4):588-95. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2008.02915.x.
4. Yu X., Lin J., Yu Q. [et al.]. Activation of Toll-like receptor 9 inhibits lipopolysaccharide-induced receptor activator of nuclear factor kappa- B ligand expression in rat B lymphocytes. *Microbiol Immunol.* 2014; 58(1):51-60. DOI: 10.1111/1348-0421.12129.
5. Sánchez E., Sabio J.M., Callejas J.L., [et al.]. Association study of genetic variants of pro-inflammatory chemokine and cytokine genes in systemic lupus erythematosus. *BMC Med Genet.* 2006; 7:48. DOI: 10.1186/1471-2350-7-48
6. Ranao D.R., Kelley S.L., Tapping R.I. Human lipopolysaccharide-binding protein (LBP) and CD14 independently deliver triacylated lipoproteins to Toll-like receptor 1 (TLR1) and TLR2 and enhance formation of the ternary signaling complex. *J Biol Chem.* 2013; 288(14):9729-41. DOI: 10.1074/jbc.M113.453266.
7. Gaini S., Koldkjaer O.G., Pedersen C., Pedersen S.S. Procalcitonin, lipopolysaccharide-binding protein, interleukin-6 and C-reactive protein in community-acquired infections and sepsis: a prospective study. *Crit Care.* 2006; 10(2):R53. DOI: 10.1186/cc4866
8. Dlugosz A., Nowak P., D'Amato M., [et al.]. Increased serum levels of lipopolysaccharide and anti-flagellin antibodies in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil.* 2015; 27(12):1747-54. DOI: 10.1111/nmo.12670.
9. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению системной красной волчанки. Под ред. Е.Л.Насонова. Москва, 2013, 24с.
10. Маколкин В.И. Овчаренко С.И. Внутренние болезни: Учебник. -5-е издание перераб.-М.: «Медицина». 2005:534-535
11. Асеева Е.А., Соловьев С.К., Насонов Е.Л. Современные методы оценки активности системной красной волчанки. *Науч-практич. ревматол.* 2013; 51(2): 186-200.
12. Гордиенко А.И. Улучшенный метод получения флуоресцентного зонда для определения липополисахарид-связывающих рецепторов методом проточной лазерной цитофлуориметрии. *Таврический медико-биологический вестник.* 2007; Т.10, №4: 156-60.
13. Афанасьева Г.А., Чеснокова Н.П., Дальвадянц С.М. [и соавт.]. Эндотоксин *Yersinia pestis*: особенности структуры, рецепции и механизмов индукции цитопатогенных эффектов. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2008; № 98: 43-8.
14. Гордиенко А.И., Копаянко А.И., Бакова А.А., [и соавт.]. Влияние комплексного лечения с применением пробиотиков и энтеросорбентов на эндотоксин- связывающий потенциал лейкоцитов и эндогенную интоксикацию у пациентов с передним увеитом, ассоциированным с HLA-B27 антигеном. *Таврический медико-биологический вестник.* 2012; Т.15, №2(58), ч.3:75-8.
15. Carey L. Shive, Wei Jiang, Donald D. Anthony, Michael M. Lederman. Soluble CD14 is a nonspecific marker of monocyte activation. *AIDS.* 2015; 29(10):1263-1265. DOI: 10.1097/QAD.0000000000000735.
16. Bosshart H., Heinzelmann M. Spontaneous decrease of CD14 cell surface expression in human peripheral blood monocytes *ex vivo*. *J Immunol Methods.* 2011; 368(1-2):80-3. DOI: 10.1016/j.jim.2011.03.006.
17. Sigifredo Pedraza-Sánchez, Amy G. Hise, Lakshmi Ramachandra [et al.]. Reduced frequency of a CD14+ CD16+ monocyte subset with high Toll-like receptor 4 expression in cord blood compared to adult blood contributes to lipopolysaccharide hyporesponsiveness in newborns. *Clin Vaccine Immunol.* 2013; 20(7): 962-971. *Clin Vaccine Immunol.* 2013 Jul; 20(7): 962-971. DOI: 10.1128/CVI.00609-12/
18. Simon J.K., Wahid R., Maciel M., [et al.]. Antigen-specific B memory cell responses to lipopolysaccharide (LPS) and invasion plasmid antigen (Ipa) B elicited in volunteers vaccinated with live-attenuated *Shigella flexneri* 2a vaccine candidates. *Vaccine.* 2009; 27(4): 565-572. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.10.081.
19. Wong C.K., Ho C.Y., Li E.K. [et al.]. Elevation of proinflammatory cytokine (IL-18, IL-17, IL-12) and Th2 cytokine (IL-4) concentrations in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2000; Vol.9, Sup.8:589-93.
20. Chávez-Sánchez L., Chávez-Rueda K., Legorreta-Haquet M.V. [et al.]. The activation of CD14, TLR4 and TLR2 by MMLDL induces IL-1 β , IL-6, and IL-10 secretion in human monocytes and macrophages. *Lipids in Health and Disease* 2010; Vol.9:119-23. DOI: 10.1186/1476-511X-9-117.
21. Грачев С.В., Прохоренко И.Р., Зубова С.В. Участие TOLL-подобного рецептора 4 в интернализации бактерий *E.coli* нейтрофилами человека в присутствии липополисахаридов. *Медицинская иммунология* 2012; Т.14, №3: 219-22.
22. Абрамова К.В. Состояние клеточного и фагоцитарного звеньев иммунитета у больных ревматоидным артритом с сопутствующей гастропатией. *Таврический медико-биологический вестник.* 2012; Т.15, №4(60): 14-17.
23. Jankowska R., Zak-Nejmark T., Małolepszy J., [et al.]. Effect of hydrocortisone treatment on oxygen metabolism and phagocytosis of peripheral blood neutrophils in asthmatic patients, sensitive and resistant to glucocorticosteroid therapy. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 1994;42(5-6):383-6.
24. Boghossian S.H., Isenberg D.A., Wright G., [et al.]. Effect of high-dose methylprednisolone therapy on phagocyte function in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 1984; 43(4): 541-550.
25. Salmon J.E., Kapur S., Meryhew N.L., [et al.]. High-dose, pulse intravenous methylprednisolone enhances Fc gamma receptor-mediated mononuclear phagocyte function in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1989; 32(6):717-25.
26. Meduri Umberto G., Kanangat Siva, Bronze Michael. [et al.]. Effects of Methylprednisolone on Intracellular Bacterial Growth. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001; 8(6): 1156-1163. DOI: 10.1128/CDLI.8.6.1156-1163.2001.
27. You Y., Qin Y., Lin X. [et al.]. Methylprednisolone attenuates lipopolysaccharide-induced Fractalkine expression in kidney of Lupus-prone MRL/lpr mice through the NF-kappaB pathway. *BMC Nephrol.* 2015;16:148. DOI: 10.1186/s12882-015-0145-y.

Сведения об авторах:

Шадура Денис Владимирович - аспирант и ассистент кафедры внутренней медицины №2, Медицинской академии им. С.И. Георгиевского ФГАОВО «КФУ им. В.И. Вернадского». e-mail: shadden@mail.ru , тел. +7(978)-823-99-76

Поступила 31.10.2016 г.