

Е.В. Митичкина¹, С.Г. Морозов², И.А. Захарова², Е.Н. Волкова³, И.В. Елистратова¹

Лейкоцитарная эластаза, альфа 1-протеиназный ингибитор и С-реактивный белок у пациентов с замедленной негативацией серологических реакций после лечения ранних форм сифилиса

¹ Главный военный клинический госпиталь внутренних войск МВД России, 143900, Моск. обл., г. Балашиха, Вишняковское ш., вл. 101

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

³ Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1

Исследована активность лейкоцитарной эластазы, альфа 1-протеиназного ингибитора и содержание С-реактивного белка у пациентов с замедленной негативацией серологических реакций (ЗНСР) после полноценного лечения сифилиса. По результатам исследований пациенты с ЗНСР разделились на три подгруппы. В первую подгруппу вошли пациенты, у которых отсутствовали признаки неспецифической реакции иммунной системы, и отсутствие негативации серологических реакций у них, видимо, обусловлено иммунологическими нарушениями. Вторую подгруппу составили пациенты с явными признаками инфекционного процесса в организме, у которых были повышены значения содержания исследуемых медиаторов воспаления. Возможно, что у этого контингента трепонема полностью не элиминирована из организма. В третью подгруппу были отнесены оставшиеся пациенты с сомнительными результатами, где нельзя однозначно сказать о наличии или отсутствии инфекционного процесса и, соответственно, трепонемы. Полученные результаты могут иметь большое значение для определения дальнейшей тактики лечения пациентов с ЗНСР.

Ключевые слова: сифилис, замедленная негативация серологических реакций, лейкоцитарная эластаза, альфа 1-протеиназный ингибитор, С-реактивный белок

E.V. Mitichkina¹, S.G. Morozov², I.A. Zakharova², E.N. Volkova³, I.V. Elistratova¹

Leukocyte elastase, alpha 1-proteinase inhibitor and C-reactive protein in patients with delayed negativation of serological reactions after treatment of early syphilis

¹ Main Military Clinical Hospital of Russian Ministry of Internal Affairs, ow. 101, Vishnyakovskaya highway, 143900, Moscow region, Balashikha, Russia

² Institute of General Pathology and Pathophysiology, RAMS, 8, Baltiyskaya str., 125315, Moscow, Russia

³ Pirogov Russian National Research Medical University, 1, Ostrovityanov str., 117997, Moscow, Russia

It was investigated the activity of leukocyte elastase, alpha 1-proteinase inhibitor and C-reactive protein in patients with delayed negativation of serological reactions after a treatment of syphilis. The patients were divided into three subgroups. The first subgroup consisted of patients who did not have the signs of non-specific immune system response. Second subgroup consisted of patients with clear signs of infection process. The patients this subgroup had elevated values of the contents of inflammatory mediators. The remaining patients with questionable results were attributed in the third subgroup. The obtained results can be of great value to determine further treatment strategy in patients with delayed negativation of serological reactions.

Key words: syphilis, delayed negativation of serological reactions, leukocyte elastase, alpha 1-proteinase inhibitor, C-reactive protein

Замедленная негативация серологических реакций (ЗНСР) через год после полноценного лечения ранних стадий сифилиса — это отсутствие негативации реакции связывания комплемента с трепонемным и кардиолипидным антигенами (РСК), при наличии снижения титра реактивов (не более чем в 4 раза) или снижения степени позитивности РСК [5, 7, 8].

Вопрос о причинах замедления негативации серологических реакций после полноценного лечения сифилиса по сей день остается актуальным в современной венерологии. Известно, что ЗНСР после терапии сифилиса с использованием различных методик по данным разных авторов составляет от 15% до 30% [2, 4, 5, 9].

В настоящее время существует несколько теорий формирования ЗНCR. Ряд исследователей связывают ЗНCR с формированием иммунопатологических нарушений. Рассматриваются различные варианты этих нарушений: от иммунодефицитных состояний по клеточному звену и нарушения функционирования макрофагов до формирования аутоиммунных реакций в организме больных. Согласно одной из гипотез, длительное течение инфекционного процесса создает условия для образования антиидиотипических антител (АИАТ), способных воспроизводить структурные и функциональные свойства номинального антигена, что ведет к длительному поддержанию продукции антител к антигенам бледной трепонемы за счет индуцирующего влияния АИАТ на соответствующие идиотип-позитивные Т- и В-клетки, т.е. развитию относительно замкнутого иммунологического цикла, не реагирующего на проводимое лечение [10, 17].

Согласно другой точке зрения, наиболее вероятной причиной ЗНCR является персистенция бледных трепонем в организме в L-форме, в форме цист или заключенных в полимембранные фагосомы, сосуществующих, таким образом, с организмом хозяина и обеспечивающих в то же время антигенную стимуляцию [3, 4, 11, 14].

Установление причин ЗНCR является достаточно сложной задачей, решение которой необходимо для выбора стратегии дальнейшего лечения пациентов с ЗНCR. Поэтому существует необходимость поиска критериев наличия *T. pallidum* в организме, т.к. остается открытым вопрос, в каких случаях возбудитель присутствует в организме, а в каких — нет.

Одним из подходов для решения данного вопроса является исследование показателей неспецифической защиты организма. Ранее проводились исследования нейтрофильного фагоцитоза, уровня интерлейкина-1, интерлейкина-2, неоптерина и бета-2-микроглобулина у пациентов с ЗНCR [7, 12]. Однако полученные результаты не позволяют однозначно утверждать о сохранении или элиминации *T. pallidum* в организме.

Для изучения активности инфекционного процесса нами были выбраны три фактора неспецифической иммунной защиты: лейкоцитарная эластаза (ЛЭ), α_1 -протеиназный ингибитор (α_1 -ПИ) и С-реактивный белок. Лейкоцитарная эластаза является одним из протеолитических ферментов нейтрофилов. Активность ЛЭ регулируется α_1 -ПИ, который снижает протеолитическую активность ЛЭ и играет важную регуляторную роль в противовоспалительных процессах [6, 17]. С-реактивный белок (СРБ) является одним из центральных участников острой фазы воспаления. СРБ является наиболее ранним и чувствительным лабораторным индикатором активности инфекционного процесса и исследование его содержания широко при-

меняется для мониторинга и контроля эффективности терапии различных инфекций [11, 15, 16].

Цель исследования — определение активности ЛЭ, α_1 -ПИ и содержания СРБ в сыворотке крови у пациентов с ЗНCR для определения вероятности элиминации *T. pallidum* после лечения ранних форм сифилиса.

Методика

Были исследованы сыворотки пациентов с ЗНCR (n = 172) и с негативацией серологических реакций (НСР) (n=118) после проведенного лечения сифилиса в возрасте от 31 до 50 лет, а также здоровых доноров возрастом от 28 до 46 лет (n = 120). Большинство пациентов с ЗНCR и НСР получали специфическую терапию по поводу скрытого раннего сифилиса (85,8%). У 12,7% пациентов был вторичный сифилис кожи и слизистых, у 1,5% — первичный сифилис половых органов. Специфическое лечение больные со скрытыми формами сифилиса получали дюрантными препаратами пенициллина (ретарпен или экстенциллин), водорастворимым пенициллином (бензилпенициллина натриевая соль) и препаратами средней дюрантности (цефтриаксон). При вторичном сифилисе применялись дюрантные препараты и натриевая соль пенициллина. При первичном сифилисе пациенты получали бензатина бензилпенициллин.

Клинико-серологический контроль (КСК) после окончания специфического лечения осуществлялся 1 раз в 3 месяца в течение первого года наблюдения и 1 раз в 6 мес. в последующие годы с постановкой нетрепонемных тестов (реакция связывания компонента с трепонемным и кардиолипидным антигенами и реакции микропреципитации), 1 раз в год — с постановкой соответствующего трепонемного теста, который использовался при диагностике заболевания (реакция иммобилизации бледной трепонемы, реакция иммунофлуоресценции, реакция пассивной гемагглютинации, иммуноферментный анализ).

Больные ранними формами сифилиса с НСР находились на КСК до негативации серологических нетрепонемных тестов, а затем еще в течение 6-12 мес., в течение которых было проведено 2 обследования. Длительность КСК определялась индивидуально в зависимости от результатов лечения.

В группу пациентов с ЗНCR не были включены лица с сопутствующей инфекционной патологией (вирусные гепатиты В, С и др.), аутоиммунными заболеваниями и какой-либо хронической патологией (гастрит, дуоденит, язвенная болезнь желудка и 12-перстной кишки, хронический пиелонефрит и др.).

Для определения активности ЛЭ и α_1 -ПИ использовали наборы реагентов «ЭЛАСТАЗА» и «АЛЬФА-1-ПИ» (ООО «Биофарм-тест»).

Для определения активности ЛЭ, находящейся в сыворотке крови в комплексе с $\alpha 1$ -ПИ применяли спектрофотометрический метод с использованием в качестве хромогенного субстрата N-терт-бутоксикарбонил-аланин- ρ -нитрофенилового эфира (ВОС-Ala-ONp) в присутствии ацетонитрила [6, 17]. В присутствии органического растворителя и при определенном составе буферного раствора происходит разрыхление комплекса, приводящее к оттеснению ингибитора и проникновению ВОС-Ala-ONp к активному центру фермента.

Спектрофотометрический метод определения активности $\alpha 1$ -ПИ в сыворотке крови основан на взаимодействии этого ингибитора с трипсином при использовании в качестве субстрата N- α -бензоил-L-аргинин-этилового эфира (БАЭЭ): $\alpha 1$ -ПИ сыворотки крови образует с трипсином комплекс, не расщепляющий БАЭЭ. Поэтому активность $\alpha 1$ -ПИ определяется по степени торможения расщепления трипсином низкомолекулярного субстрата.

Определение концентрации СРБ в образцах сыворотки крови проводили с использованием коммерческой тест-системы для количественного определения СРБ методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) (Имтек, Москва, Россия). Опре-

деление СРБ проводилось в системе твердофазного сэндвич-ИФА. Тест-система укомплектована моноспецифическими кроличьими антителами к СРБ человека, часть которых иммобилизована на внутренней поверхности 96-луночных полистирольных планшетов для ИФА, а другая часть антител использовалась для приготовления конъюгата с пероксидазой хрена. В результате последовательного внесения в лунки планшета исследуемого образца сыворотки и пероксидазного конъюгата антител к СРБ образуются иммунные комплексы. После внесения субстратного буферного раствора регистрируется оптическая плотность, отражающая ферментативную активность связанной пероксидазы. Величина оптической плотности раствора пропорциональна концентрации СРБ в пробе. Для построения калибровочной кривой использовался очищенный СРБ человека.

Статистический анализ полученных результатов проводили в программе «Statistica 6.0». Использовали непараметрические методы математической статистики. Для сравнения результатов в двух независимых выборках применяли U критерий Манна—Уитни и критерий Колмогорова—Смирнова, для сравнения результатов в двух зависимых выборках или двух зависимых переменных — непараметрический критерий Вилкоксона. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Таблица 1

Активность лейкоцитарной эластазы у пациентов с замедлением негативации серологических реакций, негативацией серореакций, и у здоровых доноров

Исследуемая группа	Норма (105–200 нмоль/мин × мл)	Слабо повышена (201–250 нмоль/мин × мл)	Умеренно повышена (251–300 нмоль/мин × мл)	Сильно повышена (более 300 нмоль/мин × мл)
Здоровые доноры (n = 120)	92,5% (n = 111)	7,5% (n = 9)	0,0% (n = 0)	0,0% (n = 0)
ЗНСР (n = 172)	31,4% (n = 54)	25,6% (n = 44)	28,5% (n = 49)	14,5% (n = 25)
НСР (n = 118)	90,7% (n = 107)	9,3% (n = 11)	0,0% (n = 0)	0,0% (n = 0)

Таблица 2

Активность $\alpha 1$ -протеиназного ингибитора у пациентов с замедлением негативации серологических реакций, негативацией серореакций, и у здоровых доноров

Исследуемая группа	Норма 28–32 ИЕ/мл	Выше 32 ИЕ/мл	Ниже 28 ИЕ/мл
Здоровые доноры (n = 120)	95,8% (n = 115)	1,7% (n = 2)	2,5% (n = 3)
ЗНСР (n = 172)	33,1% (n = 57)	18,6% (n = 32)	48,3% (n = 83)
НСР (n = 118)	86,4% (n = 102)	10,2% (n = 12)	3,4% (n = 4)

Таблица 3

Содержание С-реактивного белка в сыворотке крови пациентов с замедлением негативации серологических реакций, негативацией серореакций, и у здоровых доноров

Исследуемая группа	Содержание С-реактивного белка, мг/л				
	Менее 5 (норма)	5–12	12–25	25–50	Более 50
Здоровые доноры (n = 120)	96,7% (n = 116)	3,3% (n = 4)	0,0% (n = 0)	0,0% (n = 0)	0,0% (n = 0)
ЗНСР (n = 172)	37,2% (n = 64)	20,3% (n = 35)	12,8% (n = 22)	18,6% (n = 32)	11,0% (n = 19)
НСР (n = 118)	86,4% (n = 102)	9,3% (n = 11)	4,2% (n = 5)	0,0% (n = 0)	0,0% (n = 0)

Результаты и обсуждение

Проведено изучение активности ЛЭ, α 1-ПИ и концентрации СРБ в сыворотках крови пациентов с ЗНСР, НСР, а также здоровых доноров. Полученные результаты представлены в табл. 1, 2 и 3.

Наиболее выраженные изменения изучаемых показателей наблюдались в группе пациентов с ЗНСР. В группе пациентов с НСР незначительное повышение содержания СРБ, активности ЛЭ и α 1-ПИ не более чем у 15% обследуемых можно связать с какими-либо инфекционными или деструктивными процессами в организме, не связанными с возбудителем сифилиса. Этим же, вероятно, обусловлены и незначительные отклонения от нормы исследуемых показателей у отдельных здоровых доноров. Кроме того, незначительное повышение СРБ не всегда является отражением инфекционного процесса. Оно может наблюдаться при диабете, уремии, гипертонии, при повышенной физической нагрузке, при низкой физической активности, нарушениях сна, хронической усталости [1].

Проведена комплексная оценка полученных результатов по измерению активности ЛЭ и α 1-ПИ и концентрации СРБ в сыворотках обследуемых пациентов с ЗНСР. Оказалось, что изменения активности ЛЭ, α 1-ПИ и концентрации СРБ не всегда четко коррелировали между собой.

У многих пациентов с ЗНСР (43%, $n = 74$) наблюдалось увеличение активности ЛЭ на фоне сниженной активности α 1-ПИ и повышения концентрации СРБ. Снижение активности α 1-ПИ, по-видимому, указывает на истощение антипротеиназной защиты организма вследствие длительного повышения активности ЛЭ, что является, в целом, неблагоприятным прогностическим фактором в плане дальнейшего развития деструктивных процессов [6, 17]. Такое сочетание исследуемых показателей косвенно свидетельствует о наличии инфекционного процесса в организме этих пациентов.

Слабо повышенная активность ЛЭ при повышенной активности α 1-ПИ и нормальных показателях концентрации СРБ наблюдалась у 4,7% пациентов ($n = 8$). У нескольких обследуемых с ЗНСР (1,7%, $n = 3$) обнаружилась очень высокая активность ЛЭ при нормальных показателях α 1-ПИ и СРБ, а ещё у нескольких пациентов (2,9%, $n = 5$) слабое повышение активности ЛЭ и концентрации СРБ сочеталось с нормальными значениями активности α 1-ПИ.

Среди пациентов с пониженной активностью α 1-ПИ у одной части активность ЛЭ была в пределах нормы, но был незначительно повышен СРБ, у другой части наоборот — нормальные уровни СРБ сочетались со слабо повышенной активностью ЛЭ.

Следует особо отметить, что 28,5% обследуемых пациентов с ЗНСР имели нормальные значения всех трех исследуемых показателей, что косвенно свидетельствует об элиминации *T. pallidum* в результате лечения сифилиса. Причиной ЗНСР в данном случае являются, скорее всего, иммунные нарушения, не связанные с присутствием *T. pallidum* в организме.

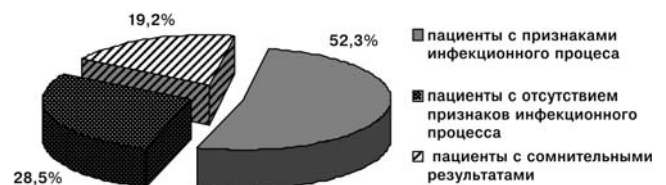
Проанализировав комплексно полученные данные, мы пришли к выводу, что всех обследуемых пациентов с ЗНСР можно разделить на три подгруппы в соответствии с показателями неспецифического иммунитета (рисунок).

В первую подгруппу вошли пациенты, у которых отсутствовали признаки неспецифической реакции иммунной системы (28,5%). Это пациенты с нормальными значениями активности ЛЭ, α 1-ПИ и концентрации СРБ. По-видимому, как уже было сказано, у этих пациентов трепонема в организме отсутствует, а отсутствие негативации серологических реакций обусловлено аутоиммунными нарушениями.

Вторую подгруппу составили пациенты с сильно отличающимися от нормы всеми исследуемыми показателями неспецифической защиты (52,3%), что является признаком инфекционного процесса в организме. Есть все основания полагать, что у этого контингента трепонема полностью не элиминирована из организма.

В третью подгруппу были отнесены оставшиеся пациенты с сомнительными результатами, где нельзя однозначно сказать о наличии или отсутствии инфекционного процесса и, соответственно, сделать вывод об элиминации трепонемы из организма.

Есть основания полагать, что полученные результаты могут иметь большое значение для определения дальнейшей тактики лечения пациентов с ЗНСР. В настоящее время не существует единой точки зрения на ведение таких пациентов. Исследователи, полагаящие, что в основе ЗНСР лежит персистенция *T. pallidum* в организме, считают необходимым дальнейшее продолжение антибиотикотерапии [2, 4, 10]. Те, кто связывает ЗНСР с развитием аутоиммунных нарушений, призывают игнорировать подобные диагностические тесты [7].



Распределение пациентов с замедлением негативации серологических реакций по признаку наличия инфекционного процесса.

Наиболее рациональным, вероятно, является дифференцированный подход к ведению таких пациентов. Тем из них, у кого исследуемые в работе показатели свидетельствуют об активном инфекционном процессе, по-видимому, показана дальнейшая антибиотикотерапия. Пациентам, у кого комплекс показателей неспецифического иммунитета в пределах нормы, вероятно, следует рекомендовать дальнейшее наблюдение без применения повторных курсов антибиотикотерапии. Однако данный подход требует проведения дальнейших углубленных исследований.

Список литературы

1. **Вельков В.В.** С-реактивный белок «золотой маркер», многозначительный и незаменимый. — Пущино, 2005. — 10 с.
2. **Данилов С.И., Назаров П.Г.** Новая концепция формирования серорезистентности после лечения сифилиса // Инфекции, передаваемые половым путем. — 2000. — №2. — С. 16-19.
3. **Дмитриев А.Г., Афонин А.В.** О возможной причине возникновения серорезистентности при сифилитической инфекции // Вестник дерматологии и венерологии. — 2003. — №2. — С. 47-48.
4. **Дмитриев Г.А., Фриго Н.В.** Сифилис. Дифференциальный клинико-лабораторный диагноз. — М.: Медицинская книга, 2004. — 364 с.
5. **Довжанский С.И.** Клиническая оценка серорезистентности при сифилисе // Русский медицинский журнал. — 1998. — Т. 6, №15. — С. 977-980.
6. **Доценко В.Л., Нешкова Е.А., Яровая Г.А.** Выявление лейкоцитарной эластазы из комплекса с плазменным ингибитором по ее энзиматической активности с синтетическим субстратом // Вопр. мед. химии. — М. — 1994. — Т. 40, №3. — С. 20-25.
7. **Ломоносов К.М.** Иммунорегуляторные нарушения как причина серорезистентности и замедленной негативации серологических реакций при сифилисе (клинико-иммунологические аспекты): Дисс. на соискание ученой степени д.м.н. — М., 2000. — С. 18-20.
8. **Мыскин В.С., Лосева О.К., Катунин Г.Л.** «Серорезистентность» при сифилисе в практике дерматовенеролога // Инфекции, передаваемые половым путем. — 2003. — №2. — С. 24-26.
9. **Мыскин В.С., Магарышкина О.В.** О контингенте больных сифилисом с развившейся серорезистентностью // Вестник последипломного образования. — 2001. — №2. — С. 43-45.
10. **Назаров П.Г., Старченко М.Е., Касаткин Е.В., Данилов С.И.** Новая концепция формирования серорезистентности при сифилисе // Вестник дерматологии и венерологии. — 1996. — №6. — С. 17-19.
11. **Нестеренко В.Г., Аковбян В.А., Петренко Л.А.** и др. Серорезистентность после лечения сифилиса: дурнанные пенициллины и новый серологический диагностический комплекс // Российский журнал кожных и венерических болезней. — 2005. — №4. — С. 12-16.
12. **Соколовский Е.В.** Серологическая резистентность после лечения сифилиса. Причины и факторы развития, профилактика и лечение: Автореф. дисс. на соискание ученой степени д.м.н. — СПб., 1995. — С. 15-16.
13. **Lafond R.E., Lukehart S.A.** Biological basis for syphilis // Clin. Microbiol. Rev. — 2006. — Vol. 19, №1. — P. 29-49.
14. **Li J., Wang L.N., Zuo Y.G.** et al. Clinical analysis and study of immunological function in syphilis patients with seroresistance // Zhonghua Yi Xue Za Zhi. — 2009. — Vol. 89, №12. — P. 813-816.
15. **Pepys M.B., Hirschfield G.M.** C-reactive protein: a critical update // J. Clin. Invest. — 2003. — Vol. 111, №12. — P. 1805-1812.
16. **Szalai A.J.** The biological functions of C-reactive protein // Vasc. Pharmacol. — 2002. — Vol. 39, №3. — P. 105-107.
17. **Visser L., Blout E.** The use of p-nitrophenyl N-tert-butylloxycarbonyl-L-alaninate as substrate for elastase // Biochim. Biophys. Acta. — 1972. — Vol. 268, №1. — P. 257-260.

Поступила 01.12.13

Сведения об авторах:

Митичкина Елена Валентиновна — врач-дерматовенеролог, Главный военный клинический госпиталь внутренних войск МВД России

Морозов Сергей Георгиевич — д-р мед. наук, проф., чл.-корр. РАМН, зав. лаб. нейроиммунопатологии ФГБУ НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН (e-mail: biopharm@list.ru)

Захарова Ирина Александровна — канд. биол. наук, старш. науч. сотр. лаб. нейроиммунопатологии ФГБУ НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН

Волкова Е.Н. — профессор кафедры дерматовенерологии лечебного факультета, Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова»

Елистратова И.В. — врач-дерматовенеролог, Главный военный клинический госпиталь внутренних войск МВД России