

УДК 616.017.1:616-092:577.114:616-079

ДИСБАЛАНС ГУМОРАЛЬНОГО ЗВЕНА АНТИЭНДОТОКСИНОВОГО ИММУНИТЕТА КАК ВЕРОЯТНЫЙ ФАКТОР ПАТОГЕНЕЗА АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

© 2019 г. А. И. Гордиенко¹, В. А. Белоглазов¹, А. В. Кубышкин¹,
Н. В. Химич¹, М. Ю. Яковлев², *

¹ФГАОУ ВО Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского,
Медицинская академия им. С.И. Георгиевского, Симферополь, Россия

²ФГБНУ Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии,
Москва, Россия

*E-mail: yakovlev-lps@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.10.2018 г.

После доработки 22.11.2018 г.

Принята к публикации 04.02.2019 г.

Изучено содержание сывороточных антиэндоксиновых антител (АТ-ЛПС) разных классов, а также аутоантител (ААТ) классов *M* и *G* к нативной высокополимерной ДНК и денатурированной однонитевой ДНК у 28 больных акантолитической пузырчаткой. У обследованных пациентов выявлены нарушения гуморального звена антиэндоксинового иммунитета (АЭИ) в виде достоверного снижения уровней сывороточных АТ-ЛПС класса *M* в крови на фоне нормального содержания АТ-ЛПС классов *A* и *G*, что не связано с изменениями концентрации в крови общих иммуноглобулинов этих же классов. Около 30% больных акантолитической пузырчаткой характеризуются достоверным повышением уровней ААТ класса *G* к денатурированной однонитевой ДНК и нативной высокополимерной ДНК. У этой группы больных обнаружена сильная обратная корреляция между уровнями (АТ-ЛПС) классов *M* и *G* и содержанием в крови ААТ класса *G* к нативной высокополимерной ДНК. Результаты кластерного анализа свидетельствуют о наличии у больных акантолитической пузырчаткой тесных взаимосвязей между нарушениями АЭИ и активностью аутоиммунных процессов. Полученные результаты являются, по мнению авторов, важным косвенным доказательством участия ЛПС в формировании и прогрессии аутоиммунных нарушений.

Ключевые слова: антиэндоксиновый иммунитет, эндоксиновая агрессия, аутоиммунные заболевания, акантолитическая пузырчатка.

DOI: 10.1134/S0131164619030068

Кишечный эндотоксин или липополисахарид (ЛПС) и обусловленная им системная эндотоксемия (СЭЕ), является облигатным фактором гомеостаза [1], что обеспечивается, в первую очередь, способностью ЛПС активировать врожденный иммунитет благодаря взаимодействию с его ключевым рецептором — *TLR4* [2]. Роль СЭЕ в биологии человека двояка. С одной стороны, она крайне необходима и полезна для регуляции активности адаптивных систем, а с другой — зловредна, а порой и катастрофична, поскольку избыток ЛПС в общем кровотоке, получивший название эндоксиновая агрессия (ЭА), индуцирует системное воспаление. ЭА является базисным элементом патогенеза самой разнообразной патологии, к числу которой относятся аллергии, атеросклероз, воспалительная патология глаза, ДВС-синдром и послеоперационные осложнения в детской хирургии, женское бесплодие и

нервная анорексия, хронические вирусные инфекции и СПИД, сахарный диабет 1 и 2 типа, неопластические процессы [1, 3–10]. В связи с этим мы сочли вполне вероятным участие ЭА в индукции аутоиммунных заболеваний, среди которых особое место принадлежит акантолитической пузырчатке (АП), являющейся одной из наиболее тяжелых нозологических форм [11].

МЕТОДИКА

Группу больных АП составили 28 пациентов с диагнозом АП (12 мужчин и 16 женщин, средний возраст (48.3 ± 4.7) лет), находящихся на лечении в ГУ “Республиканский кожно-венерологический диспансер” (г. Симферополь). Контрольную группу составили здоровые люди ($n = 32$), которые по гендерным различиям и возрасту соответствовали группе больных АП. Материалом для

Таблица 1. Уровни сывороточных антилипополисахаридных антител разных классов у больных АП ($M \pm m$)

| Группа | Антилипополисахаридные антитела разных классов, усл. ед. | | |
|-------------------------|--|---------------------|-------------------|
| | <i>IgA</i> | <i>IgM</i> | <i>IgG</i> |
| Больные АП, $n = 28$ | 0.456 ± 0.066 | $0.206 \pm 0.027^*$ | 0.205 ± 0.032 |
| Здоровые люди, $n = 32$ | 0.349 ± 0.053 | 0.402 ± 0.051 | 0.179 ± 0.019 |

Примечание: в табл. 1, 2 и 4 достоверность различий указана по сравнению с контрольной группой здоровых людей: * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$.

исследований служила сыворотка венозной крови, которую получали общепринятым способом и хранили при -25°C . Уровни сывороточных антилипополисахаридных антител (АТ-ЛПС) классов *A*, *M* и *G* определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа. В качестве антигена использовали ЛПС *Escherichia coli* K30, который был получен из бактериальной биомассы методом водно-фенольного экстрагирования [12, 13]. Концентрацию общих иммуноглобулинов классов *A*, *M* и *G* в крови определяли микротурбидиметрическим методом [14]. Сывороточные аутоантитела (ААТ) классов *M* и *G* к высокополимерной нативной ДНК и денатурированной одонитевой ДНК определяли методом иммуноферментного анализа [15]. Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью программного пакета *STATISTICA 6.0* (*StatSoft, Inc., USA*). Достоверность различий между одноименными показателями в независимых выборках оценивали с помощью непараметрического *U*-критерия *Mann-Whitney*. Различия считались статистически значимыми при $p < 0.05$. В качестве непараметрического критерия, характеризующего наличие и силу взаимосвязей между изучаемыми параметрами, использовали коэффициент ранговой корреляции К. Спирмена. При проведении кластерного анализа применяли агломеративно-иерархический алгоритм Варда (*Ward's method*) и метрику *City-block* (*Manhattan*) в качестве матрицы расстояний, а также итерационный метод *k*-средних Мак-Кина.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного исследования было установлено (табл. 1), что у больных АП уровень АТ-ЛПС класса *M* в крови был в среднем в 1.95 раза ниже ($p < 0.01$), чем у здоровых людей, тогда как уровни АТ-ЛПС классов *A* и *G* в среднем достоверно не отличались от своих нормальных значений. При этом с помощью корреляционного анализа у больных АП обнаружена достоверная ($p < 0.05$) прямая корреляция средней силы ($r = 0.55$) между уровнями АТ-ЛПС классов *A* и *G*.

Известно, что повышение уровней сывороточных аутоантител (ААТ) к нативной двунитевой ДНК и денатурированной одонитевой ДНК у

пациентов с аутоиммунными заболеваниями являются важным диагностическим и прогностическим критерием [16]. Поскольку буллезные дерматозы, включая АП, относятся к аутоиммунной патологии, можно ожидать появления в крови больных АП антинуклеарных факторов и вовлечения их в патогенез основного заболевания. Тем не менее, в литературе были обнаружены лишь единичные работы, посвященные определению ААТ к ДНК у больных буллезными дерматозами [17]. В связи с этим у обследованных больных АП нами было изучено содержание сывороточных ААТ классов *M* и *G*, специфичных к денатурированной одонитевой ДНК и к нативной двунитевой ДНК. Результаты этих исследований представлены в табл. 2. Они свидетельствуют о том, что у больных АП уровни ААТ класса *G* к денатурированной одонитевой ДНК и нативной двунитевой ДНК были достоверно выше значений этих показателей у здоровых людей в среднем соответственно в 1.47 и в 1.28 раза ($p < 0.05$). В то же время уровни ААТ класса *M* к денатурированной одонитевой ДНК и нативной двунитевой ДНК у больных АП в среднем достоверно не отличались от своих нормальных величин. Корреляционный анализ показал, что у больных АП наблюдается достоверная сильная прямая корреляция между индивидуальными уровнями ААТ класса *G* к денатурированной одонитевой ДНК и нативной двунитевой ДНК ($r = 0.92$; $p < 0.001$). Кроме того, у больных АП была выявлена достоверная сильная прямая корреляция между уровнями ААТ класса *G* к денатурированной одонитевой ДНК в крови и содержанием сывороточных АТ-ЛПС классов *M* и *G*; а также достоверная сильная обратная корреляция между уровнями ААТ класса *G* к нативной двунитевой ДНК в крови и содержанием сывороточных АТ-ЛПС классов *M* и *G* (табл. 3).

Для более полной характеристики *B*-клеточного звена иммунитета у больных АП было изучено содержание общих *IgA*, *IgM* и *IgG* в крови. Анализ этих показателей представляется целесообразным еще и потому, что при лечении больных АП применяют высокие дозы кортикостероидов, которые оказывают выраженный иммуносупрессивный эффект [18]. Проведенные исследования показали, что у больных АП на фоне практически нормального содержания общих *IgM* и *IgG* ($p >$

Таблица 2. Уровни сывороточных аутоантител разных классов к нативной двунизовой ДНК и денатурированной одностриковой у больных АП ($M \pm m$)

| Группа | Аутоантитела к денатурированной одностриковой ДНК, усл. ед. | | Аутоантитела к нативной двунизовой ДНК, усл. ед. | |
|-------------------------|---|------------------------|--|---------------------|
| | <i>IgM</i> | <i>IgG</i> | <i>IgM</i> | <i>IgG</i> |
| Больные АП, $n = 28$ | 0.073 ± 0.007 | $0.091 \pm 0.009^{**}$ | 0.075 ± 0.006 | $0.086 \pm 0.008^*$ |
| Здоровые люди, $n = 32$ | 0.085 ± 0.005 | 0.062 ± 0.001 | 0.086 ± 0.003 | 0.067 ± 0.003 |

Примечание: обозначения см. табл. 1.

Таблица 3. Корреляционные связи между уровнями сывороточных антилиполисахаридных антител разных классов и аутоантител класса *G* к денатурированной одностриковой ДНК и нативной двунизовой ДНК у больных АП

| Показатель | Коэффициент ранговой корреляции (r) | | |
|---|--|------------|------------|
| | антилиполисахаридные антитела разных классов | | |
| | <i>IgA</i> | <i>IgM</i> | <i>IgG</i> |
| Аутоантитела класса <i>G</i> к денатурированной одностриковой ДНК | – | 0.70 | 0.89 |
| Аутоантитела класса <i>G</i> к нативной двунизовой ДНК | 0.78 | -0.93 | -0.76 |

Примечание: – отсутствие достоверной корреляции ($p > 0.05$).

> 0.05) концентрация общего *IgA* в крови достоверно ($p < 0.05$) превышала значение этого показателя у здоровых людей в среднем на 34.8% (табл. 4). С помощью корреляционного анализа выяснено, что у обследованных пациентов отсутствовала достоверная корреляция между концентрацией в крови общих *IgA*, *IgM* и *IgG*, уровнями сывороточных АТ-ЛПС этих же классов и уровнями ААТ разных классов к денатурированной одностриковой ДНК и нативной двунизовой ДНК. Это свидетельствует о том, что изменения уровней указанных антител не связаны с изменением концентрации общих иммуноглобулинов этих же классов.

С помощью кластерного анализа установлено, что обследованная выборка больных АП представлена двумя кластерами (условно обозначенными как АП-1 и АП-2), в пределах которых прослеживаются определенные ассоциативные связи между уровнями сывороточных АТ-ЛПС разных классов и содержанием в крови ААТ класса *G* к денатурированной одностриковой ДНК и нативной

двунизовой ДНК (рис. 1 и табл. 5). В АП-1 вошло 8 больных АП (28.6% от общего числа обследованных пациентов), у которых уровни ААТ класса *G* к денатурированной одностриковой ДНК были в среднем соответственно в 1.97 и в 2.03 раза выше, чем у больных АП-2 и здоровых людей, а уровни ААТ класса *G* к нативной двунизовой ДНК – в среднем соответственно в 2.16 и в 2.28 раза выше, чем у больных АП-2 и здоровых людей. При этом уровень АТ-ЛПС класса *A* у больных АП-1 был выше, чем у больных АП-2 и здоровых людей в среднем соответственно в 2.80 ($p < 0.05$) и в 2.42 раза ($p < 0.05$, а уровень АТ-ЛПС класса *G* был выше, чем у больных АП-2 и здоровых людей в среднем соответственно в 2.87 и в 2.02 раза. Вместе с тем у больных АП-1 содержание АТ-ЛПС класса *M* было в среднем в 2.23 раза ниже, чем у здоровых людей и достоверно не отличалось от величины данного показателя у больных АП-2. В АП-2 вошло 20 больных АП (71.4% от общего числа обследованных пациентов), у которых уровни ААТ класса *G* к денатурированной

Таблица 4. Концентрация общих иммуноглобулинов разных классов в крови больных АП ($M \pm m$)

| Группа | Общие иммуноглобулины разных классов, г/л | | |
|-------------------------|---|-----------------|------------------|
| | <i>IgA</i> | <i>IgM</i> | <i>IgG</i> |
| Больные АП, $n = 28$ | $2.98 \pm 0.23^*$ | 1.71 ± 0.10 | 10.94 ± 0.49 |
| Здоровые люди, $n = 32$ | 2.21 ± 0.16 | 1.77 ± 0.15 | 10.73 ± 0.16 |

Примечание: обозначения см. табл. 1.

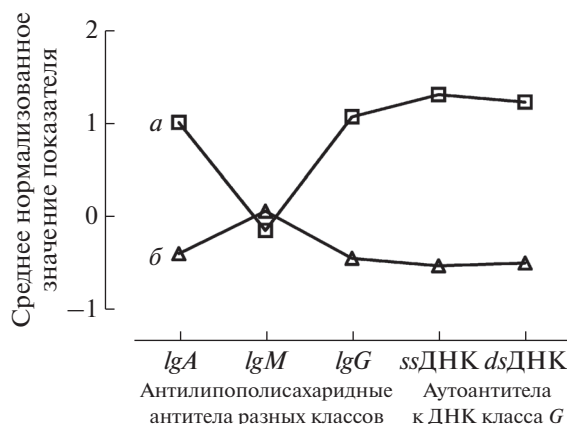


Рис. 1. Ассоциативные связи между уровнями сывороточных антилиполисахаридных антител разных классов и содержанием в крови аутоантител класса *G* к денатурированной однонитевой ДНК и нативной двунитевой ДНК для обследованной выборки больных АП (итерационный метод *k*-средних Мак-Кина). *a* – Кластер АП-1; *б* – кластер 2; *ss*ДНК – однонитевая денатурированная ДНК; *ds*ДНК – нативная двунитевая ДНК.

однонитевой ДНК и нативной двунитевой ДНК в крови, а также содержание АТ-ЛПС классов *A* и *G* достоверно не отличались от своих нормальных значений. В то же время уровни ААТ-ЛПС класса *M* у больных АП-2 были в среднем в 1.82 раза ниже, чем у здоровых людей. Определенный разброс по некоторым показателям АЭИ и ААТ у пациентов

с АП может быть проявлением волнообразности течения заболевания, как это ранее отмечалось у больных ВИЧ-инфекцией и СПИД [4], когда периоды острой ЭА сменяются “эндотоксиновой недостаточностью” (частичная утрата иммунной системы реагировать на ЛПС) с циклическим течением. Последнее может явиться предметом отдельного исследования, протокол которых должен быть расширен: определением концентрации ЛПС в общем кровотоке и маркеров системного воспаления в динамике развития заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного лабораторного исследования позволяют констатировать наличие у больных с аканталитической пузырчаткой (одной из наиболее тяжелых нозологических форм аутоиммунных заболеваний) нарушений гуморального звена антиэндотоксинового иммунитета, часть из которых прямо коррелирует с активностью аутоиммунного процесса, что косвенно подтверждает участие эндотоксина в патогенезе изучаемой патологии. Характерный для всех больных дефицит анти-ЛПС антител класса *M* свидетельствует о наличии у пациентов “эндотоксиновой недостаточности”, т.е. частичной утраты способности иммунной системы реагировать на ЛПС – относительной недостаточности антиэндотоксинового иммунитета. Свойственный пациентам с аканталитической пузырчаткой разброс иных

Таблица 5. Уровни сывороточных антилиполисахаридных антител разных классов и аутоантител класса *G* к денатурированной однонитевой ДНК и нативной двунитевой ДНК у больных АП, отнесенных к разным кластерам ($M \pm m$)

| Показатель, усл. ед. | Больные АП | | Здоровые люди ($n = 32$) |
|--|---|----------------------------------|-------------------------------|
| | АП-1 ($n = 8$; 28.6%) | АП-2 ($n = 20$; 71.4%) | |
| Антилиполисахаридные антитела класса <i>A</i> | 0.843 ± 0.121 $p < 0.001$ $p_2 < 0.001$ | 0.301 ± 0.043 $p > 0.05$ | 0.349 ± 0.053 |
| Антилиполисахаридные антитела класса <i>M</i> | 0.180 ± 0.035 $p < 0.001$ $p_2 > 0.05$ | 0.221 ± 0.035 $p < 0.001$ | 0.402 ± 0.051 |
| Антилиполисахаридные антитела класса <i>G</i> | 0.361 ± 0.080 $p < 0.001$ $p_2 < 0.01$ | 0.126 ± 0.008 $p > 0.05$ | 0.179 ± 0.019 |
| Аутоантитела класса <i>G</i> к денатурированной однонитевой ДНК | 0.126 ± 0.010 $p < 0.001$ $p_2 < 0.001$ | 0.064 ± 0.002 $p > 0.05$ | 0.062 ± 0.001 |
| Аутоантитела класса <i>G</i> к нативной двунитевой ДНК | 0.153 ± 0.018 $p < 0.001$ $p_2 < 0.001$ | 0.071 ± 0.003 $p > 0.05$ | 0.067 ± 0.003 |

Примечание: p – достоверность различий по сравнению с контрольной группой здоровых лиц; p_2 – достоверность различий по сравнению с АП-2.

изучаемых показателей может быть проявлением волнообразного течения заболевания и требует дальнейшего изучения в формате расширенного протокола, включающего в себя определение маркеров системного воспаления и концентрации ЛПС в общем кровотоке. Таким образом, результаты этих исследований существенно дополнят общепринятые представления о патогенезе аутоиммунных заболеваний и позволят значительно повысить эффективность лечебного процесса.

Этические нормы. Все исследования проведены в соответствии с принципами биомедицинской этики, сформулированными в Хельсинской декларации 1964 года и ее последующих дополнений, и одобрены локальным биоэтическим комитетом Крымского федерального университета (Симферополь).

Информированное согласие. Каждый участник исследования представил добровольное письменное информированное согласие, подписанное им после разъяснения ему потенциальных рисков и преимуществ, а также характера предстоящего исследования.

Финансирование работы. Работа выполнена при финансовой поддержке сторонних организаций.

Благодарности. Авторы выражают благодарность сотрудникам Центральной научно-исследовательской лаборатории Крымского федерального университета.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Яковлев М.Ю. Кишечный эндотоксин и воспаление. Дерматовенерология. Национальное руководство. Краткое издание. М.: Издательство "ГЭОТАР-Медиа", 2013. С. 70.
2. Cochet F., Peri F. The role of carbohydrates in the lipopolysaccharide (LPS)/Toll-Like Receptor 4 (TLR4) signalling // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. № 11. P. 2318.
3. Аниховская И.А., Кубатиев А.А., Яковлев М.Ю. Эндотоксиновая теория атеросклероза // *Физиология человека.* 2015. Т. 41. № 1. С. 89.
4. Аниховская И.А., Кубатиев А.А., Хасанова Г.Р., Яковлев М.Ю. Эндотоксиновый компонент патогенеза хронических вирусных заболеваний // *Физиология человека.* 2015. Т. 41. № 3. С. 118.
5. Гордиенко А.И., Белоглазов В.А., Кубышкин А.В. Дисбаланс показателей гуморального антиэндотоксинового иммунитета и низкоинтенсивное воспаление при сахарном диабете 1 и 2 типа // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016. Т. 60. № 3. С. 61.
6. Гордиенко А.И., Кубышкин А.В., Гордиенко А.И., Кубышкин В.А. Нарушения антиэндотоксиновой защиты у больных лейкемией и миелодиспластическим синдромом // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017. Т. 61. № 3. С. 83.
7. Мешков М.В., Гатауллин Ю.К., Иванов В.Б., Яковлев М.Ю. Эндотоксиновая агрессия как причина послеоперационных осложнений в детской хирургии (новые перспективы профилактики). М.: Издательство "Московские учебники – СиДи-Пресс", 2007, Серия: Новые лечебно-диагностические технологии. Книга 2. 143 с.
8. Окорочков П.Л., Аниховская И.А., Яковлева М.М. и др. Алиментарный фактор как вероятный индуктор воспаления или липидный компонент механизма транспорта кишечного эндотоксина // *Физиология человека.* 2012. Т. 38. № 6. С. 105.
9. Окорочков П.Л., Аниховская И.А., Волков И.Э., Яковлев М.Ю. Кишечный эндотоксин в индукции сахарного диабета 1 типа // *Физиология человека.* 2011. Т. 37. № 2. С. 138.
10. Чижиков Н.В., Лиходед В.Г., Светухин А.М., Яковлев М.Ю. Эндотоксин кишечной микрофлоры в клинике и патогенезе хронической ишемии нижних конечностей. Пенза: Издательство ПГПУ им. В.Г. Белинского 2002. 169 с.
11. Alpsoy E., Akman-Karakas A., Uzun S. Geographic variations in epidemiology of two autoimmune bullous diseases: pemphigus and bullous pemphigoid // *Arch. Dermatol. Res.* 2015. V. 307. № 4. P. 291.
12. Гордиенко А.И. Новый подход к повышению специфичности определения антител к липополисахаридам грамотрицательных бактерий методом твердофазного иммуноферментного анализа // *Укр. биохим. журн.* 2004. Т. 76. № 6. С. 130.
13. Гордиенко А.И. Оптимизация технологии выделения и очистки липополисахаридов энтеробактерий // *Имунологія та алергологія.* 2006. № 1. С. 39.
14. Гордиенко А.И., Белоглазов В.А., Гордиенко А.И. Микротурбидиметрический метод определения IgG, IgM, IgA человека // *Имунологія та алергологія.* 2000. № 1. С. 12.
15. Lacy M.J., Voss E.W. Direct adsorption of ssDNA to polystyrene for characterization of the DNA/anti-DNA interaction, and immunoassay for anti-DNA auto-antibody in New Zealand white mice // *J. Immunol. Meth.* 1989. V. 115. № 1. P. 87.
16. Eggert M., Zettl U.K., Neek G. Autoantibodies in autoimmune diseases // *Curr. Pharm. Des.* 2010. V. 16. № 14. P. 1634.
17. Ochsendorf F.R., Schöfer H., Milbradt R. Pemphigus erythematosus – Nachweis von Anti-DNA Antikörpern // *Hautarzt.* 1987. V. 38. № 7. P. 400.
18. Han A. A practical approach to treating autoimmune bullous disorders with systemic medications // *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* 2009. V. 2. № 5. P. 19.

Humoral Anti-Endotoxin Immunity Disbalance as a Probable Factor of Pathogenesis of Autoimmune Diseases

A. I. Gordienko^a, V. A. Beloglazov^a, A. V. Kubyskin^a, N. V. Khimich^a, and M. Yu. Yakovlev^{b, *}

^a*Vernadsky Crimean Federal University, Medical Academy named after Georgievsky, Simferopol, Russia*

^b*Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia*

**E-mail: yakovlev-lps@yandex.ru*

We measured the concentrations of serum antiendotoxin antibodies (AT-LPS) of different classes and auto-antibodies (AAB) of M and G classes active against native high-polymer DNA and denaturated single-strand DNA in 28 patients with acantholytic pemphigus. We observed statistically significant violations of the humoral anti-endotoxin immunity (AEI) including a significant reduction in serum levels of AT-LPS of class M with normal level of AT-LPS of classes A and G; this reduction was not associated with any changes in the concentration of other immunoglobulins of the same classes. In approximately 30% of patients with acantholytic pemphigus, the level of AATs of class G to denaturated single-stranded DNA and native high-polymer DNA was significantly elevated. In this group of patients, we also observed a strong inverse correlation between the levels of AT-LPS of classes M and G and the level of AAT of class G to native high-polymer DNA. The cluster analysis showed that impaired AEI correlates closely with the activity of autoimmune processes in patients with acantholytic pemphigus. The authors think that these findings prove the participation of LPS in the formation and progression of autoimmune disorders.

Keywords: antiendotoxin immunity, endotoxin aggression, autoimmune diseases, acantholytic pemphigus.