

НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АНТИТЕЛ К КСАНТИНОКСИДАЗЕ И ГУАНИНДЕЗАМИНАЗЕ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКИ

Александров А.В.¹, Алехина И.Ю.¹, Шилова Л.Н.², Александрова Н.В.¹, Ненашева Н.В.¹, Емельянов Н.И.², Мозговая Е.Э.¹, Александров В.А.¹, Емельянова О.И.¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии», Волгоград, e-mail: imlab@mail.ru;

² ГОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации», Волгоград, e-mail: post@volgmed.ru

Предположительно антитела к ксантинооксидазе (КО) и гуаниндезаминазе (ГДА) могут входить в состав циркулирующих иммунных комплексов, что может приводить к повышению их уровня в крови больных системной красной волчанкой (СКВ). Расширение спектра иммунологических методов диагностики СКВ может быть обеспечено внедрением в лабораторную практику иммуноферментного метода на основе иммобилизованных ферментов в качестве антигена. Было изучено содержание антител к КО и ГДА у 60 больных СКВ. Наиболее высокие уровни антител к КО отмечались у больных СКВ с поражением почек ($p=0,024$) и наличием васкулопатии ($p=0,042$), а антител к ГДА – у больных СКВ с поражением печени ($p=0,024$), почек ($p=0,016$) и у больных с выраженным цитопеническим синдромом ($p=0,039$). Появление антител к КО и ГДА в сыворотке крови больных СКВ при поражении различных органов и систем может свидетельствовать о глубине нарушения анаболических и деструктивных процессов при данном заболевании. Внедрение новых методов лабораторной диагностики СКВ может быть использовано для выявления антител к ферментам в сыворотке крови больных, что позволит более точно судить о клинико-иммунологических вариантах заболевания и даст дополнительные возможности для своевременной коррекции терапевтического воздействия.

Ключевые слова: системная красная волчанка, ксантинооксидаза, гуаниндезаминаза, антитела.

NEW OPPORTUNITIES OF USE ANTIBODIES TO XANTHINE OXIDASE AND GUANINDESAMINASE TO DEFINE CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL VARIANTS OF SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

Aleksandrov A.V.¹, Alekhina I.Yu.¹, Shilova L.N.², Aleksandrova N.V.¹, Nenasheva N.V.¹, Emelianov N.I.², Mozgovaya E.E.¹, Aleksandrov V.A.¹, Emelianova O.I.¹

¹ Federal State Budgetary Science Institution Research Institute for clinical and experimental rheumatology, Volgograd, e-mail: imlab@mail.ru;

² Volgograd State Medical University, Volgograd, e-mail: post@volgmed.ru

Presumably antibodies to xanthine oxidase (XO) and guanindesaminase (GDA) can be part of circulating immune complexes, which can lead to an increase in their levels in the blood of patients with systemic lupus erythematosus (SLE). Spreading of the spectrum techniques of immunological diagnosis of SLE may be achieved by the implementation of immunoassay method based on immobilized enzymes as antigens in laboratory practice. Levels of antibodies to the XO and GDA were studied in 60 patients with SLE. The highest levels of antibodies to XO were observed in SLE patients with renal disease ($p = 0.024$) and the presence of vasculopathy ($p = 0.042$), and antibodies to GDA – in SLE patients with liver disease ($p = 0.024$), kidney ($p = 0.016$) and in patients with severe cytopenia ($p = 0.039$). The appearance of antibodies to the DA and GDA in the serum of SLE patients with lesions of various organs and systems may be indicative of anabolic disorders and destructive processes in this disease. The introduction of new methods of laboratory diagnosis of SLE can be used to detect the antibodies to enzymes in the serum of patients. These methods will allow to estimate the clinical and immunological variants of the disease more accurately, and will provide additional opportunities for duly correction of therapeutic intervention.

Keywords: system lupus erythematosus, xanthine oxidase, guanine deaminase, antibodies.

При системной красной волчанке (СКВ) многими исследователями были отмечены генетически обусловленное несовершенство иммунорегуляторных процессов и различные

дефекты апоптоза, которые способны приводить к образованию широкого спектра антител и последующему возникновению иммунокомплексного воспаления [5,6,7]. Для гомеостаза иммунной системы контроль апоптоза имеет решающее значение, а широкий спектр аутоантител, определяемый в сыворотке крови больных СКВ, обусловлен многообразием аутоантигенов, освобождаемых и модифицированных в ходе апоптоза [2,15,17]. Часто мишенью аутоиммунных реакций при СКВ становятся ферменты основных метаболических путей организма – антиоксидантной системы и пуринового метаболизма. Одними из основных энзимов данных систем являются ксантиноксидаза (КО, ЕС 1.1.3.22) и гуаниндезаминаза (ГДА, Е.С. 3.5.4.3).

Цель исследования: совершенствование методов лабораторной диагностики с помощью иммобилизованных магнитоуправляемых антигенных наносистем на основе ксантиноксидазы и гуаниндезаминазы для выделения клинко-иммунологических вариантов СКВ.

Материалы и методы

В исследование были включены 60 больных СКВ (основная группа). Средний возраст больных СКВ составил $36,32 \pm 15,27$ (M \pm SD) лет, среди больных СКВ преобладали женщины (91,7 %), большинство составляли лица трудоспособного возраста (90 %), продолжительность СКВ составила $7,97 \pm 7,36$ лет, средний возраст дебюта болезни – $28,5 \pm 13,2$ лет. Активность СКВ оценивали с помощью индексов SLEDAI, ECLAM и по критериям, предложенными В.А. Насоновой (низкая – 9, умеренная – 34, высокая – 17 человек). Повреждение (необратимые изменения в состоянии здоровья) измеряли с помощью индекса SLICC/ACR (таблица). При оценке течения СКВ по критериям В.А. Насоновой были получены следующие результаты: у 2 пациентов имело место острое течение СКВ, у 44 – подострое, у 14 – хроническое.

Исходные показатели больных СКВ

Показатель	M	SD	95% ДИ для M
Возраст дебюта болезни (лет)	28,6	13,18	25,19...32,01
Продолжительность болезни (лет)	7,97	7,35	6,07...9,87
Активность: SLEDAI	8,93	5,74	7,45...10,4
Активность: ECLAM	5,30	2,79	4,59...6,01
Повреждение: SLICC/ACR DI	1,95	1,71	1,51...2,39

Примечание: M – среднее значение, SD – стандартное отклонение, ДИ – доверительные интервалы.

В контрольную группу вошли 30 практически здоровых лиц (доноры областной станции переливания крови) в возрасте от 18 до 40 лет (20 женщин и 10 мужчин; средний возраст – $26,0 \pm 5,6$ лет), прошедших обычное медицинское обследование.

Объектом исследований служила сыворотка крови. Антитела к КО (анти-КО) и ГДА (анти-ГДА) определяли в сыворотке крови по разработанной нами модифицированной методике иммуноферментного анализа с использованием в качестве носителя иммобилизованных магнитоуправляемых антигенных наносистем (АНС), а в качестве антигена – коммерческие препараты КО и ГДА («Sigma», США). Иммобилизацию проводили методом эмульсионной полимеризации в потоке газообразного азота с включением магнитного материала в структуру полиакриламидного геля [1]. Результаты проведенных исследований учитывали на многоканальном микропланшетном спектрофотометре при длине волны 450 нм и выражали в единицах оптической плотности (Ед). Результаты считались положительными при превышении в дублированных образцах средних показателей оптической плотности средних значений нормальных сывороток (лиц контрольной группы) на 3 стандартных отклонения.

Общеклинические лабораторные исследования выполнялись в клинической лаборатории Городской клинической больницы № 25 (г. Волгоград) унифицированными методами в соответствии с ведомственными нормативными документами, регламентирующими порядок их проведения. Был проведен ряд иммунологических проб, позволяющих охарактеризовать иммунный статус больных СКВ, включенных в исследование (иммуноглобулины классов А, М, G, ревматоидный фактор, циркулирующие иммунные комплексы, антинуклеарный фактор, СРБ, антитела к кардиолипину, антитела к нативной ДНК и др.). Анализ исходных клинических и лабораторных данных больных СКВ показал, что изолированные лабораторные показатели не могут быть использованы как индикаторы активности и тяжести течения заболевания, следовательно, необходимо проведение максимально комплексного обследования с привлечением, по возможности, дополнительных диагностических тестов.

Статистический анализ экспериментальных данных выполнялся с помощью программного пакета «STATISTICA 6.0 FOR WINDOWS» (StatSoft Inc., USA). Уровень статистической значимости различий сравниваемых показателей устанавливали с использованием t-критерия Стьюдента; непараметрического U-критерия Манна – Уитни и T-критерия Уилкоксона. Результат считался достоверным при $p < 0,05$ [8].

Результаты исследования

В группе здоровых лиц содержание ($M \pm SD$) анти-КО составило $0,032 \pm 0,022$ Ед, а анти-ГДА – $0,049 \pm 0,021$ Ед. Положительными считались результаты, превышающие уровень

анти-КО > 0,098 Ед и уровень анти-ГДА > 0,112 Ед. У больных СКВ показатели ($M \pm SD$) анти-КО составили $1,31 \pm 0,83$ Ед, анти-ГДА – $1,27 \pm 0,82$ Ед. Количество больных СКВ с повышенным уровнем анти-КО и анти-ГДА составило 53,3 % и 51,7 %, соответственно. Повышенный уровень данных антител не был выявлен ни у одного обследованного в контрольной группе.

Содержание анти-КО и анти-ГДА исследовали в зависимости от показателей СКВ, характеризующих развитие патологического процесса на всем его протяжении.

Была установлена значимая связь уровня анти-КО с повреждением, определяемым с помощью индекса SLICC/ACR: коэффициент корреляции составил 0,29 ($p=0,022$). При сравнении пациентов СКВ, не имевших повреждения (значения индекса равны 0) ($n=15$, 25%), с больными, имевшую любую степень повреждения ($n=45$, 75 %) содержание анти-КО было заметно ниже в первой группе больных ($0,097 \pm 0,056$ против $0,14 \pm 0,044$; $p=0,041$). При проведении корреляционного анализа была выявлена связь анти-КО с тяжестью поражения почек ($r=0,31$; $p=0,024$), а также наличием у больных СКВ цитопенического синдрома ($r=0,35$; $p=0,012$). Сравнение между собой групп больных СКВ, позитивных и негативных по наличию анти-КО, продемонстрировало статистически достоверное увеличение частоты выявления признаков поражения почек ($p=0,032$) и ретикуло-эндотелиальной системы ($p=0,021$), также была отмечена большая доля больных с наличием васкулопатии среди пациентов с наличием антител к КО ($p=0,042$).

Между уровнем анти-ГДА в сыворотке крови больных СКВ и активностью патологического процесса была выявлена статистически значимая корреляция (индекс SLEDAI: $r=0,361$, $p=0,012$; индекс ECLAM: $r=0,333$, $p=0,011$). У больных СКВ также была отмечена отрицательная корреляция уровня анти-ГДА со значениями биохимической активности гуаниндезаминазы в сыворотке крови ($r= -0,35$). Наиболее высокие уровни анти-ГДА отмечались у больных СКВ с поражением печени ($p=0,024$) и у больных с выраженным цитопеническим синдромом ($p=0,039$). Следует подчеркнуть, что в группе больных СКВ, позитивных по анти-ГДА, также статистически значимо чаще выявлялось поражение печени (χ^2 с поправкой Йетса=18,95, $p=0,001$) и анемия (χ^2 с поправкой Йетса=6,92, $p=0,009$).

Обсуждение полученных результатов

Собственные белки организма в нормальных условиях приводят, как правило, к развитию естественной толерантности, так как основные антигенные детерминанты этих белков распознаются Т-клетками и не могут вызвать образование антител [2]. В случае изменения конформации белка на его поверхности появляются «скрытые эпитопы», то есть такие антигенные детерминанты, которые не участвовали в процессе выработки иммунологической толерантности, а, значит, распознаются как чужеродные антигены [12].

Одной из причин конформационных изменений структуры белка могут явиться активные формы кислорода (АФК) и усиление перекисного окисления липидов (ПОЛ). При СКВ имеет место накопление АФК, вторичных свободнорадикальных продуктов, которые активно реагируют с молекулами в ближайшем окружении [11], а в результате этих процессов происходит усиление перекисидации мембранных структур и нарастание дефектов в контроле апоптоза клеток. Отмечено, что развитие патологических процессов при СКВ сопровождается нарушением регуляции апоптоза лейкоцитов [9] и нейтрофилов [14], причем снижение уровня апоптоза нейтрофилов сопровождается усилением образования активных форм кислорода и уменьшением резервного потенциала клеток [5]. Дефекты апоптоза приводят к усилению секвестрации аутоантигенов в апоптотические тельца, что в итоге способствует срыву толерантности, созданию «новых эпитопов» и, как следствие, увеличению выработки аутоантител. Чрезмерное образование свободных радикалов при СКВ вызывает повреждение мембран макрофагов, эритроцитов и других клеточных структур [3], а также способствует выходу в экстрацеллюлярное пространство многих биологически активных веществ, в том числе и ферментов, таких как КО и ГДА. Наличие антигенных свойств у ферментов обеспечивает ответную реакцию при их выходе из клетки, а воздействие различных факторов воспаления усиливает антигенные свойства энзимов, вследствие окисления их функциональных групп [4].

Повышение активности прооксидантной КО (О-форма фермента) вследствие повышения проницаемости мембран у больных СКВ способствует выходу из клеток различных протеаз, что также сопровождается генерацией супероксидных радикалов и нарастанием активности КО. О влиянии анти-КО на активность фермента можно судить по выявленной нами прямой корреляции умеренной силы ($r = 0,49$; $p < 0,001$) между активностью фермента и уровнем данных антител. Принимая во внимание также обнаруженную обратную корреляцию высокой силы ($r = -0,64$; $p < 0,001$) между активностью КО и активностью ксантиндегидрогеназы (КДГ, D-форма фермента), можно предположить, что при СКВ антитела к КО оказывают определенное влияние на трансформацию КО \leftrightarrow КДГ в сторону увеличения образования прооксидантной формы фермента (КО, О-форма фермента). Предположительно это влияние выражается в изменении функциональной активности КО, когда под воздействием антител к КО происходит усиление процессов трансформации D-формы фермента в О-форму, что в итоге ведет к существенному увеличению генерации супероксидных радикалов.

Особый интерес представляют полученные нами данные о зависимости уровня анти-КО от наличия у больных СКВ различных клинических проявлений. При проведении

корреляционного анализа была выявлена связь анти-КО с тяжестью поражения почек ($p=0,024$), а также наличием у больных СКВ цитопенического синдрома ($p=0,012$).

Наряду с этим, анализ связей уровня анти-КО с лабораторными и иммунологическими показателями также позволил выделить связь слабой и средней силы с индикаторами поражения почек при СКВ – протеинурией ($r=0,26$; $p=0,037$), лейкоцитурией ($r=0,36$; $p=0,002$) и эритроцитурией ($r=0,28$; $p=0,021$), что позволяет рассматривать анти-КО как дополнительный индикатор волчаночной нефропатии. В проведенном нами исследовании поражение почек было крайне разнообразно (от стойкой невыраженной протеинурии и микрогематурии до быстро прогрессирующего гломерулонефрита) и выявлялось у 24 (40 %) больных СКВ, причем у подавляющего большинства (15 человек) волчаночный нефрит развился в течение первых 6 лет от начала заболевания, а у 12 % больных поражение почек было первым проявлением СКВ. Следует отметить, что наибольшие диагностические трудности вызывали больные с поражением почек без иммунологических и морфологических признаков СКВ в первые годы заболевания.

ГДА считается относительно органоспецифичным ферментом для печени, поэтому любая патология данного органа, сопровождаемая гепатоцеллюлярным повреждением, приводит к повышенному выбросу энзима в кровь. В связи с этим нами были исследованы активность ГДА и уровень анти-ГДА в сыворотке крови 9 больных СКВ с признаками патологии печени (изменение осадочных проб, повышения активности АлАТ, АсАТ, общего билирубина, ультразвуковые изменения в паренхиме печени, гепатомегалия и др.). У данной группы больных было отмечено увеличение показателей как активности ГДА ($p=0,042$), так и анти-ГДА ($p=0,034$).

Одновременно было проведено исследование ферментативной и иммунологической активности ГДА у 16 больных хроническим гепатитом, которое показало достоверное повышение активности ГДА по сравнению с донорами ($p=0,036$) и незначительное повышение по сравнению с больными СКВ с признаками поражения печени ($p>0,05$). Что же касается анти-ГДА, то у больных с хроническим гепатитом мы наблюдали отсутствие статистически значимых различий со здоровыми лицами ($p>0,1$) и достоверно низкие значения в сравнении с больными СКВ с признаками поражения печени ($p=0,006$). В связи с этим, при наличии печеночной патологии у больных СКВ в затруднительных случаях необходимо рассматривать факт повышения активности ГДА не только за счет активности патологического процесса, но и вследствие возможного поражения данного органа, ориентируясь, в первую очередь, на уровень анти-ГДА и имеющуюся клиническую картину заболевания.

Появление анти-ГДА в сыворотке крови больных СКВ может свидетельствовать о глубине нарушения анаболических и деструктивных процессов при данном заболевании. Дальнейшее изучение анти-ГДА и выяснение их влияния на биохимическую активность этого фермента у больных СКВ с позиций изучения отдельных звеньев патогенеза заболевания и клинического варианта патологического процесса способно содействовать улучшению выбора метода терапевтического воздействия и контроля эффективности проводимой терапии.

Заключение

Механизмы образования аутоантител при системных заболеваниях соединительной ткани, таких как СКВ, до настоящего времени окончательно не определены. Внедрение новых методов диагностики на основе АНС в лабораторную практику может быть использовано для выявления антител к ферментам, в частности к ферментам пуринового метаболизма, в сыворотке крови больных СКВ, что позволит более точно характеризовать различные клинико-иммунологические варианты течения заболевания, и может предоставить дополнительные возможности для своевременной коррекции терапевтического воздействия. В целом, детальное изучение процессов образования антител к КО и ГДА может быть использовано для составления более полной картины иммунологических нарушений, составляющих основу системных аутоиммунных заболеваний.

Список литературы

1. Гонтарь И.П. Эмульсионная полимеризация как метод, модифицирующий ферменты с сохранением биологических свойств их наноструктур / И.П. Гонтарь, Г.Ф. Сычева, А.В. Александров, Л.Н. Шилова, Е.С. Симакова, Н.Н. Емельянов, Н.Н. Матасова, Л.А. Маслакова, А.Б. Зборовский // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – Т. 150. – № 12. – С. 715-719.
2. Заводовский Б.В. Системная красная волчанка. Этиопатогенез и лабораторная диагностика // Справочник заведующего КДЛ. – 2012. – № 10. – С.9-24.
3. Заводовский Б.В. Влияние терапии ксидифоном на гистохимические показатели больных системной красной волчанкой / Б.В. Заводовский, И.А. Зборовская, Е.Г. Трофимова, Л.Е. Сивордова // Научно-практическая ревматология. – 2005. – № 3. – С. 44.
4. Зборовская И.А., Ханов А.Г., Капустина Е.А. Учебник практической ревматологии (Руководство для врачей). – Изд-во Войналович Александр Владимирович. – Ростов-на-Дону, 2016. – 376 с.

5. Ильин М.В. Клинико-патогенетическое значение определения показателей функциональной активности и апоптоза нейтрофилов у больных системной красной волчанкой / М.В. Ильин, П.А. Мальцева, Е.В. Речкина, Н.И. Коршунов // Практическая медицина. – 2011. – № 52. – С.101-103.
6. Насонов Е.Л. Клинические рекомендации. Ревматология / под ред. Е.Л. Насонова. – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2010. – 288 с.
7. Ревматология: национальное руководство / под ред. Е. Л. Насонова, В. А. Насоновой. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 720 с.
8. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – М.: Медиасфера, 2006. – 312 с.
9. Романова Н.В. Окислительный стресс циркулирующих фагоцитов и поражения органов и систем при системной красной волчанке // Фундаментальные исследования. – 2005. – № 2. – С. 34.
10. Сорока Н.Ф. Апоптоз лимфоцитов периферической крови у больных системной красной волчанкой: патогенетические и клинические аспекты / Н.Ф. Сорока, А.И. Свирновский, А.Л. Рекун // Научно-практическая ревматология. – 2006. – № 4. – С. 44-52.
11. Ahsan H. Oxygen free radicals and systemic autoimmunity / H. Ahsan, A. Ali, R. Ali // Clin. Exp. Immunol. – 2003. – Vol. 131, № 3. – P. 398-404.
12. Deshmukh U.S. Mechanisms of autoantibody diversification to SLE-related autoantigens./ U.S. Deshmukh, F. Gaskin, J.E. Lewis, C.C. Kannapell, S.M. Fu // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2003. – Vol. 987. – P. 91-98.
13. Gordon C., Update on systemic lupus erythematosus: autoantibodies and apoptosis / C. Gordon, M. Salmon // Clin. Med. – 2001. – № 1. – P.10-14.
14. McConnell J., Neutrophils from systemic lupus erythematosus patients demonstrate increased nuclear DNA damage / J. McConnell, A. Crockard, A. Cairns // Clin. Exp. Rheumatol. – 2002. – № 20 (5). – P. 653-660.
15. Mevorach D. Systemic lupus erythematosus and apoptosis: a question of balance // Clin. Rev. Allergy Immunol. – 2003. – Vol. 25, № 1. – P.49-60.
16. Uhlen M. Towards a knowledge-based Human Protein Atlas / M. Uhlen, P. Oksvold, L. Fagerberg, E. Lundberg, K. Jonasson, M. Forsberg, M. Zwahlen, C. Kampf, K. Wester, S. Hober, H. Wernerus, L. Björling, F. Ponten // Nat. Biotechnol. – 2010. – Vol. 28(12). – P.1248-50.
17. White S. Apoptosis in systemic lupus erythematosus / S. White, A. Rosen // Curr. Opin. Rheum. – 2003. – Vol. 15, № 5. – P.557-562.