

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ АУТОАНТИТЕЛ НА АКТИВНОСТЬ ОСНОВНЫХ ЭНЗИМОВ ПУРИНОВОГО МЕТАБОЛИЗМА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ РЕВМАТИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Александров А.В.¹, Шилова Л.Н.², Александрова Н.В.¹, Ненашева Н.В.¹,
Александров В.А.¹, Емельянов Н.И.²

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

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

Для своевременной диагностики ревматических заболеваний целесообразно расширение круга используемых в клинической практике иммунологических показателей. Наиболее перспективным является определение различных аутоантител, в том числе к ферментам пуринового метаболизма (ПМ), с помощью иммуноферментного метода (ИФА). Это может быть достигнуто при создании необходимых условий для перевода растворимых биополимеров (энзимов) в нерастворимую форму с сохранением их биологических свойств и возможностью дальнейшего использования в качестве антигенной матрицы в иммунологических методах диагностики. В ходе исследования удалось получить иммобилизованные формы основных ферментов ПМ (аденозиндезаминаза, 5-нуклеотидаза, пуридинуклеозидфосфорилаза, гуаниндезаминаза, ксантиноксидаза, аденозинкиназа), причем процедура иммобилизации не вызывала изменения их биологических свойств. При определении антител к ферментам ПМ в сыворотке крови больных ревматоидным артритом и системной красной волчанкой применение иммобилизованных ферментов (в качестве антигенной матрицы) в разработанном нами варианте ИФА позволило повысить чувствительность этого метода в 3–4 раза, по сравнению с традиционным вариантом ELISA-теста.

Ключевые слова: антитела, ферменты, пуриновый метаболизм, ревматоидный артрит, системная красная волчанка

THE STUDY OF THE EFFECT OF AUTOANTIBODIES ON THE ACTIVITY OF KEY ENZYMES OF PURINE METABOLISM IN BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH RHEUMATIC DISEASES

Aleksandrov A.V.¹, Shilova L.N.², Aleksandrova N.V.¹, Nenasheva N.V.¹,
Aleksandrov V.A.¹, Emelianov N.I.²

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

For the timely diagnosis of rheumatic diseases the expansion of the clinical immunological parameters is expedient. The definition of the different autoantibodies, including purine metabolism enzymes (PM), using enzyme immunoassay (EIA) is most promising assay. This can be achieved by creating the necessary conditions for the transfer of soluble biopolymers (the enzyme) to an insoluble form while preserving their biological properties and the possibility of further use as antigen matrix in immunological diagnostic methods. The study was able to get immobilized form of basic PM enzymes (adenosine deaminase, 5-nucleotidase, purine nucleoside phosphorylase, guanase, xanthine oxidase, adenosine kinase), the immobilization procedure did not cause any changes in their biological properties. The use of immobilized enzymes (as an antigen matrix) in IFA in form, which was developed by us, allowed to enhance the sensitivity of this method in 3–4 times as compared with the conventional one ELISA-test in determining the antibodies to PM enzymes in the serum of patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus.

Keywords: antibodies, enzymes, purine metabolism, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus

Ревматические заболевания (РЗ) занимают важное место в структуре заболеваемости населения и имеют огромное социально-экономическое значение, находясь в ряду основных причин временной и стойкой нетрудоспособности, а также существенного ухудшения

качества жизни [1, 2]. Для своевременной диагностики РЗ целесообразно расширение круга используемых клинико-лабораторных, и в первую очередь иммунологических показателей [5, 9]. Для определения аутоантител (Ат) в сыворотке крови больных РЗ используются самые различные подходы, но в настоящее время наиболее широко применяются иммуноферментный (ИФА) и иммунофлюоресцентный методы анализа [9].

Иммунная система обладает определенной автономностью в распознавании и удалении чужеродных клеток, антигенов и других веществ, но, наряду с этим, она находится под строгим гомеостатическим контролем, участие в котором принимает и множество биохимических реакций. Существующая биохимическая гетерогенность большинства РЗ, очевидно, обусловлена наличием конституциональной биохимической индивидуальности человека и зависит от нарушений именно надмолекулярного порядка, затрагивающих клеточные, тканевые, системные уровни.

Расширение спектра изучаемых при РЗ аутоантител (в том числе и к ферментам различных метаболических путей) может быть достигнуто переводом растворимых биополимеров в нерастворимую форму с сохранением их биологических свойств и возможностью дальнейшего использования в качестве антигенной матрицы в иммунологических методах диагностики.

Взросший интерес к изучению метаболизма пуриновых соединений в норме и при патологии связан не только со значением пуринового метаболизма (ПМ) в обмене нуклеиновых кислот, но и с той важной биологической ролью, которую выполняют его отдельные, составные части: ферменты и промежуточные субстраты. Учитывая характерные иммунологические нарушения при РЗ, можно предположить, что изменение ферментативной активности ряда ферментов пуринового метаболизма может быть связано с гиперпродукцией аутоантител к ним.

Цель исследования: получить иммобилизованные формы основных ферментов ПМ, изучить их физико-химические свойства, отработать условия и технику постановки иммуноферментного анализа с использованием антигенных наносистем (АНС) на основе ферментов ПМ для определения специфических аутоантител в сыворотке крови больных РЗ.

Материалы и методы

В качестве антигенов использовались коммерческие препараты основных ферментов пуринового метаболизма производства фирмы «Sigma-Aldrich» (США): препарат аденозиндезаминазы (АДА, Adenosine deaminase from human erythrocytes, Cat. № BCR-647, с активностью 2,55 $\mu\text{kat/l}$; сертифицированный эталонный материал); препарат 5'-нуклеотидазы (5-НТ, 5'-Nucleotidase human, Cat. № N 1665, recombinant, expressed in CHO cells); препарат пуридиннуклеозидфосфорилазы (ПНФ, Nucleoside Phosphorylase from human blood; Cat. № N 3514); препарат гуаниндезаминазы (ГДА, Guanase from rabbit liver; Cat. № G

5752); препарат ксантиноксидазы (КО, Cat. № X 2252), а также препарат аденозинкиназы (АДК, Human Adenosine Kinase Protein, Novus Biologicals, Cat. № NBP1-44382 и Human Adenosine Kinase Recombinant Protein, Abnova Corporation (HQ), Taiwan R.O.C., Cat. № H00000132 -P01).

Для получения иммобилизованных форм изучаемых ферментов использовали растворы с соответствующей концентрацией: для АДА – 100 мкг/мл, для 5'-НТ – 100 мкг/мл; для ПНФ – 50 мкг/мл; для ГДА – 20 мкг/мл; для КО – 50 мкг/мл и для АДК – 50 мкг/мл.

Результаты ELISA-тестов учитывали на многоканальном микропланшетном спектрофотометре при длине волны 450 нм, полученные значения выражали в единицах оптической плотности (Ед). Наличие антител считалось положительным при превышении значений оптической плотности на 3 стандартных отклонения от средних значений контрольной группы.

В группу исследования были включены 178 больных ревматоидным артритом (РА) и 60 больных системной красной волчанкой (СКВ).

Диагностика РА осуществлялась в ходе всестороннего клинического обследования при поступлении больных на стационарное лечение с использованием диагностических критериев Американской ревматологической ассоциации (АРА) и уточнялась в процессе лечения. Под наблюдением находились 178 больных РА, из которых 126 (70,8 %) женщин и 52 (29,2 %) мужчин. Средний возраст больных – $48,9 \pm 13,2$ года. Средняя продолжительность РА составила $11,14 \pm 2,33$ года. I (минимальная) степень активности РА выявлена у 34 (19,1 %), II (умеренная) – у 128 (71,9 %) и III (максимальная) – у 16 (9 %) больных. Следует отметить, что поражения сердца, почек, ревматоидные узелки, лимфаденопатия и церебральный васкулит чаще отмечались у больных с высокой активностью ревматоидного процесса. Выявлялась определенная зависимость частоты системных поражений от степени активности патологического процесса: чем выше активность РА, тем больше частота внесуставных поражений (при активности I – 29,4 %, при активности II – 34,4 %, при III степени активности заболевания – 87,5 %).

Диагноз СКВ ставился на основании тщательного клинико-лабораторного обследования больных и верифицировался по модифицированным критериям американского общества ревматологов 1982 года, пересмотренным в 1997 году. Средний возраст больных СКВ составил $36,32 \pm 15,27$ лет. Среди больных СКВ преобладали женщины (91,7 %), абсолютное большинство составляли лица трудоспособного возраста (90 %), вместе с тем 41 пациент (68,3 %) имел ту или иную степень стойкой утраты трудоспособности. Активность СКВ оценивалась с помощью индексов SLEDAI ($8,93 \pm 5,74$) и ECLAM ($5,30 \pm 2,79$), а также по критериям, предложенных

В.А. Насоновой. Повреждение (необратимые изменения в состоянии здоровья) измерялось с помощью индекса SLICC/ACR DI ($1,95 \pm 1,71$).

Статистический анализ экспериментальных данных выполнялся с помощью программных пакетов «STATISTICA 6.0 FOR WINDOWS» (StatSoft Inc., USA).

Результаты исследования

Учитывая достаточную относительную молекулярную массу используемых в исследовании ферментов (АДА – 36 кДа, 5'-НТ – 60-120 кДа; ПНФ – 90-92 кДа; ГДА – 100-120 кДа; КО – 240 кДа; АДК – 40 кДа), иммобилизацию проводили методом эмульсионной полимеризации в модификации И.П. Гонтаря с соавт. [4] в потоке газообразного азота с включением в структуру гранул магнитного материала. По завершении полимеризации гранулы магнитосорбентов в течение 15–20 мин отмывали ацетоном и физиологическим раствором с детергентом твин-20 (0,05 %) от непрореагировавших мономеров, эмульгатора и гексана.

В итоге были получены АНС, представляющие собой двойные полиакриламидные гранулы правильной сферической формы с размером частиц от 10 до 100 мкм. Средний диаметр гранул составил $58 \pm 7,2$ мкм (при соотношении полимерный носитель : железо 2 : 1, в пересчете на сухую массу). Гранулы имели длительный срок хранения (до 24-х месяцев); после регенерации они были пригодны для повторного использования в методах иммуноанализа [3].

Процедура иммобилизации АДА, ГДА, 5'-НТ, ПНФ не вызывала изменения биологических свойств ферментов (табл. 1).

Таблица 1

Влияние иммобилизации на биологические свойства ферментов

Фермент	Ферментативная активность	
	Иммобилизованная форма	Растворимая форма
АДА, Ед/мл	$57,6 \pm 1,72$	$61,9 \pm 1,64$
5'-НТ, Ед/л	$39,3 \pm 4,89$	$42,6 \pm 5,61$
ПНФ, мкмоль/л/мин	$20,7 \pm 3,12$	$21,5 \pm 2,93$
ГДА, МЕ/л	$27,7 \pm 4,01$	$27,5 \pm 3,94$
КО, Ед	$62,2 \pm 3,42$	$67,4 \pm 3,91$
АДК, Ед/мл	$48,3 \pm 2,85$	$52,2 \pm 4,16$

Активность иммобилизованной формы большинства ферментов (АДА, 5-НТ, ПНФ, ГДА и АДК) сохранялась более года (КО до 9–10 месяцев), в то время как для растворимой формы энзимов было отмечено существенное снижение активности уже через 2–3 месяца.

Наряду с этим, иммобилизация повышает устойчивость ферментов к воздействию высоких температур: после автоклавирования активность растворимых форм изучаемых ферментов снизилась практически до нуля, а иммобилизованных – незначительно (для АДА и 5-НТ уменьшилась на 5 %, для ПНФ – на 12 %, для ГДА и АДК – на 10 %, для КО – на 14 %).

На этапе выбора предпочтительного варианта иммуноферментного метода определения Аг к ферментам был проведен сравнительный анализ методики ИФА, основанной на использовании микротитрационных полистироловых планшетов (классический вариант ELISA-теста), и разработанного нами варианта ИФА с использованием АНС. Предполагаемые различия в результатах (при использовании классического варианта ИФА и иммуноферментной методики с применением АНС) могли быть объяснены с точки зрения свойств адсорбции белка на полистироле (анализ на микротитрационных полистироловых планшетах) и включения белка в структуру геля (анализ с помощью АНС) и кинетики реакции образования комплекса антиген-антитело на разделе фаз.

Сорбционная емкость гранулы АНС, рассчитанная с использованием модели Esser P. (1997 г.), более чем в 10 раз превышает площадь поверхности лунки (для планшета Nunc MaxiSorp) при традиционном варианте ИФА. В одной пробе доступность для реакции антигена почти в 3 раза больше при использовании гранул АНС, чем при постановке анализа с антигеном, сорбированном на планшете [6].

При постановке иммуноферментного анализа с использованием АНС наблюдаются как повышение аффинности, связанное с разделением фаз и повышением локальной эффективной концентрации связывающих участков антигена на разделе фаз, так и существенное увеличение концентрации антигена (в нашем случае ферментов ПМ) при уменьшении объема реагентов. Кроме того, помещение гранул АНС в переменное магнитное поле вызывает перемещение фаз друг относительно друга, в результате чего вероятность встречи антигенраспознающего центра антител, находящихся в жидкой фазе, с антигеном, фиксированном на твердой фазе, существенно повышается. Также этим достигается перемешивание компонентов системы, предотвращающее неравномерность распределения компонентов в растворе, и реакция антиген – антитело смещается в направлении образования комплекса.

Таким образом, учитывая, что модифицированная методика иммуноферментного анализа с использованием АНС имеет очевидные преимущества перед методиками, использующими в качестве твердой фазы полистироловый планшет [5], при проведении исследований, направленных на изучение процессов антителогенеза к ферментам ПМ, предпочтение было отдано ИФА с использованием АНС.

В группу исследования были включены 178 больных с достоверным диагнозом ревматоидного артрита [7] и 60 больных с достоверным диагнозом системной красной волчанки [8].

Количество больных РА с повышенным уровнем Ат к АДА (при проведении ИФА с использованием АНС) составило 98 человек, к 5'-НТ – 96 человек, к ПНФ – 106 человек, к ГДА – 80 человек, к КО – 106 человек, к АДК – 36 человек. Различия в эффективности выявления антител к ферментам ПМ у больных РА при использовании двух вариантов ИФА представлены в таблице 2.

Таблица 2

Количество больных РА с повышенным уровнем антител к ферментам ПМ при использовании стандартного ELISA-теста и ИФА на основе АНС, в %

к ферментам ПМ	Количество больных с повышенным уровнем антител к ферментам ПМ при использовании в методах ИФА	
	Стандартный ELISA-тест	ИФА на основе АНС
АДА	15,2	55,1
5'-НТ	25,3	53,9
ПНФ	17,4	59,6
ГДА	9,55	44,9
КО	22,5	59,6
АДК	6,74	20,2

Количество больных СКВ с повышенным уровнем Ат к АДА (при проведении ИФА с использованием АНС) составило 32 человека, к 5'-НТ – 32 человека, к ПНФ – 25 человек, к ГДА – 29 человек, к КО – 30 человек, к АДК – 28 человек. Различия в эффективности выявления антител к ферментам ПМ у больных СКВ при использовании двух вариантов ИФА представлены в таблице 3.

Таблица 3

Количество больных СКВ с повышенном уровнем антител к ферментам ПМ при использовании стандартного ELISA-теста и ИФА на основе АНС, в %

к ферментам ПМ	Количество больных с повышенным уровнем антител к ферментам ПМ при использовании в методах ИФА	
	Стандартный ELISA-тест	ИФА на основе АНС
АДА	16,7	53,3
5'-НТ	23,3	53,3

ПНФ	10,0	41,6
ГДА	8,33	48,3
КО	18,3	50,0
АДК	11,7	46,7

Применение иммобилизованных ферментов в разработанном нами варианте ИФА с использованием АНС позволило повысить чувствительность этого метода в 3–4 раза, по сравнению с традиционным вариантом ИФА, в первую очередь, за счет увеличения концентрации антигенов в 20–100 раз, площади соприкосновения фиксированных антигенов с антителами, частоты встречаемости иммобилизованных антигенов с магнитными свойствами с соответствующими иммуноглобулинами при применении магнитной мешалки.

Вырабатываемые антитела способны модифицировать фермент, ингибируя или усиливая его энзиматическую активность. Кроме того, сами антитела и иммунные комплексы могут проявлять свойства ферментов, что в определенной степени может объясняться их возможными конформационными изменениями при взаимодействии с антигеном. Одной из возможных причин изменения активности ферментов ПМ в сыворотке крови больных РЗ может являться изменение иммунного статуса с усилением антителообразования к данным энзимам.

Заключение

Изучение процессов образования и функционирования Ат к основным ферментам ПМ у больных РЗ с помощью АНС в иммуноферментном методе, а также исследование «срыва» толерантности к наиболее защищенным от воздействия иммунной системы белковым структурам – энзимам, способно помочь в определении влияния Ат к ферментам ПМ на функционирование соответствующих энзимов и обозначить роль данных Ат в активации патологического процесса и развитии повреждения при РЗ.

Список литературы

1. Бегун Д.Н. Многомерная модель факторов риска развития ревматических болезней. Социальные аспекты здоровья населения [электронный научный журнал] 2014; 35(1). URL: http://vestnik.mednet.ru/content/view/539/30/lang_ru.
2. Галушко Е.А. Медико-социальная значимость ревматических заболеваний: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Москва, 2011. – 46 с.
3. Гонтарь И.П., Сычева Г.Ф., Александров А.В., Шилова Л.Н., Симакова Е.С., Емельянов Н.Н., Матасова Н.Н., Маслакова Л.А., Зборовский А.Б. Эмульсионная полимеризация как метод,

модифицирующий ферменты с сохранением биологических свойств их наноструктур // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – Т. 150, № 12. – С. 715-719.

4. Гонтарь И.П., Зборовский А.Б., Левкин С.В., Сычева Г.Ф. Способ получения магнитных полиакриламидных гранул // Авторское свидетельство № 1582657. – 1990.

5. Насонов Е.Л., Александрова Е.Н. Современные стандарты лабораторной диагностики ревматических заболеваний. – М., 2006. – С. 3.

6. Сущук Е.А. Клинико-диагностическое значение определения антител к церулоплазмину у больных системной красной волчанкой с использованием гранулированных антигенных препаратов с магнитными свойствами: дис. ... канд. мед. наук. – Волгоград, 2002. – 237 с.

7. American College of Rheumatology / European League Against Rheumatism classification criteria for rheumatoid arthritis // *Arthritis & Rheumatism*. – Vol. 62, N 9. – P. 2569–2580.

8. Hochberg M.C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus // *Arthritis Rheum*. 1997; 40(9): 1725-9.

9. Wiik A.S., Gordon T.P., Kavanaugh A.F., Lahita R.G., Reeves W., van Venrooij W.J., Wilson M.R., Fritzler M., and the IUIS/WHO/AF/CDC Committee for the Standardization of Autoantibodies in Rheumatic and Related diseases. Cutting edge diagnostics in rheumatology: the role of patients, clinicians, and laboratory scientists in optimizing the use of autoimmune serology // *Arthritis Rheum*. (Arthritis Care & Research) 2004; 51: 291-8.