

## ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ И ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ГЛУТАТИОНРЕДУКТАЗЫ ПРИ СИСТЕМНОЙ СКЛЕРОДЕРМИИ

Трофименко А.С., Емельянова О.И., Русанова О.А., Зборовская И.А.

*ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А.Б. Зборовского», Волгоград, e-mail: emelyanova.vlg@mail.ru*

**Цель исследования:** изучение роли антител к глутатионредуктазе в патогенезе, диагностике, прогнозе при склеродермическом процессе. В исследование были включены 30 доноров и 45 больных системной склеродермией. Все больные имели направительный диагноз «системная склеродермия» и дали информированное согласие на участие. Донорам и больным исследовали кровь на наличие антител к глутатионредуктазе иммуноферментным методом с использованием магнитоуправляемых сорбентов при поступлении в стационар и перед выпиской. В ходе исследования было обнаружено, что у больных системной склеродермией наблюдаются снижение ферментативной активности глутатионредуктазы и повышение концентрации антител к ней по сравнению с донорами. Обнаружена статистически значимая закономерность зависимости количества иммуноглобулинов к изучаемому ферменту от активности и характера течения данного заболевания. Для определения активности при системной склеродермии нами была использована комплексная оценка двух показателей: ферментативной активности глутатионредуктазы и концентрации антител к ней. Определено, что аутоантитела к глутатионредуктазе чаще выявляются у больных системной склеродермией с высокой степенью активности заболевания, подострым и острым течением, при наличии поражения сердца, легких, что было убедительно подтверждено корреляционным анализом. Очень важно, что антитела к глутатионредуктазе выявляются на ранних стадиях развития склеродермического процесса и имеют особенное диагностическое значение, а определение динамики их возникновения может стать основой для коррекционной оценки эффективности проводимой терапии. Изменение биохимической активности глутатионредуктазы, увеличение титра антител к ней могут быть дополнительными критериями диагностики системной склеродермии. Мониторинг этих показателей показал преимущество введения в комплекс лечения экстракорпоральных методов лечения, таких как плазмаферез, а исследования в системе биохимической активности глутатионредуктазы и антителообразования к ней помогут нам еще больше узнать о развитии склеродермического процесса.

**Ключевые слова:** глутатионредуктаза (ГР), системная склеродермия (ССД), антитела, магнитосорбенты.

## DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC VALUE OF GLUTATHIONE REDUCTASE IN SYSTEMIC SCLERODERMA

Trofimenko A.S., Emelyanova O.I., Rusanova O.A., Zborovskaya I.A.

*FSBI Research Institute for Clinical and Experimental Rheumatology named after A.B. Zborovskiy, Volgograd, e-mail: emelyanova.vlg@mail.ru*

**Objective:** studying the role of glutathione reductase antibodies in the pathogenesis, diagnosis and prediction in scleroderma. Thirty apparently healthy individuals and 45 patients with systemic scleroderma were assessed. Upon admission to hospital and prior to discharge all subjects had their blood tested for glutathione reductase antibodies by the method of immunoenzyme assay. It was established that in patients with systemic scleroderma the oxidase activity of glutathione reductase was lower while the level of antibodies was higher than in the control group. It was revealed that the amount of antibodies to this enzyme was associated with the activity and the nature of the course of the disease. The activity of systemic scleroderma was assessed using a complex of two parameters: enzymatic activity of glutathione reductase and the level of its antibodies. It was established that autoantibodies to glutathione reductase were more often revealed in systemic scleroderma patients with high activity of the disease, subacute and acute course of the disease, with involvement of the heart, lungs. It was found that glutathione reductase antibodies were revealed at early stages of scleroderma and thus can be employed as a diagnostic tool. Lower enzymatic activity of glutathione reductase and higher levels of its antibodies can serve as an additional criterion in diagnosing the activity of systemic scleroderma. Inclusion of these parameters into monitoring of therapy administered in hospital settings allows assessing the effectiveness of the therapy and making appropriate adjustments.

**Keywords:** glutathione reductase, systemic scleroderma, antibodies, magnetocontrollable sorbents, antibodies.

По современным представлениям, системная склеродермия – это хроническое аутоиммунное заболевание с несомненно прогрессирующим течением, сопровождающееся склеродермическим поражением кожи, органными изменениями и ангиопатиями [1].

Изучение системной склеродермии ведется на протяжении многих лет, но полностью изучить эту проблему не представляется возможным. Затрудняют ее диагностику большой полиморфизм и вариабельность клинической картины системной склеродермии, не полностью изученный патогенез заболевания [2–4].

Поиск маркеров системного склероза продолжается до настоящего времени. В патогенезе склеродермического процесса все чаще ведущую роль отводят свободнорадикальным механизмам тканевого повреждения, при которых, несомненно, большую роль играют активные формы кислорода (АФК). В организме существует антиоксидантная система (АОС), которая держит под контролем продукцию АФК и способна, в свою очередь, регулировать окислительные процессы в ней. В эту систему входит целый ряд ферментов, которые катализируют патогенный эффект активных форм кислорода. В условиях аутоиммунной патологии (в данном случае речь идет о склеродермическом процессе) происходят активация ПОЛ и окислительная реакция белков. Очевидно, это осуществляется за счет фрагментации или агрегации белковых молекул. Окислительная реакция аминокислот ферментов приводит к изменению структуры белка, его оксидантной активности, а также к изменению иммунологических свойств – к антителообразованию. При склеродермии также происходит выработка антител к ферментам АОС и, в частности, к глутатионредуктазе (ГР) [5, 6]. Глутатионредуктаза – фермент, который катализирует восстановление окисленного глутатиона. Восстановленный глутатион принимает непосредственное участие в глутатионпероксидазной реакции; кроме этого, он обладает еще и антиоксидантным действием. Мы неслучайно выбрали этот фермент для исследования: обладая мультиферментными свойствами, ГР является одним из важных ферментов-антиоксидантов. Аутоиммунные сдвиги при склеродермическом процессе, возникновение антигенных детерминант глутатионредуктазы могут происходить как в результате ее участия в дезактивации АФК, так и при индукции антител к ней. Глутатионредуктаза играет немаловажную роль в патогенезе ревматических заболеваний. Основное место содержания глутатионредуктазы – это растворимые части клеток, но выделяют и мембраносвязанные формы фермента. ГР также играет немаловажную роль в защите структуры эритроцитов от возникающих перекисных соединений. Более существенная активация процесса перекисного окисления липидов происходит именно на уровне мембраны эритроцита, степень которой часто зависит от структуры мембраны и первоначальной активности ферментов, связанных с мембраной. Активность

глутатионредуктазы резко повышается в сыворотке крови человека при инфаркте, а в эритроцитах – при наследственной недостаточности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, поэтому этот фермент и используют в диагностических целях [7]. При склеродермическом процессе возникает дисбаланс между синтезом и утилизацией кислорода. Причины его возникновения не совсем изучены. Одним из факторов функциональной недостаточности энзимов является образование антител (АТ) к ним. В результате взаимодействия глутатионредуктазы со свободными радикалами происходит изменение стереометрии молекулы ГР и непосредственная блокада ее активных центров, что, в свою очередь, приводит к снижению ферментативной активности данного фермента. Даже повышенный синтез фермента не может полностью компенсировать его ферментативной недостаточности в условиях такого аутоагрессивного склеродермического процесса [8, 9].

Цель исследования: изучение роли антител к глутатионредуктазе в патогенезе, диагностике, прогнозе при склеродермическом процессе.

#### **Материалы и методы исследования**

В исследование были включены 30 доноров областной станции переливания крови г. Волгограда и 45 больных ССД отделения ревматологии ГУЗ ГБ№ 25 г. Волгограда. Все пациенты подписали информированное согласие на обследование, которое проводилось в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Международной медицинской ассоциации пересмотра 2013 г. (ACR/EULAR). В исследование были включены пациенты старше 18 лет, имеющие подтвержденный диагноз ССД. В исследовании использовалась ГР с активностью 340 Ед/мг, активность ГР определяли по методу Hosoda и Nakamura, описанному М.А. Шифриным (1977).

Концентрацию антител к ГР определяли иммуноферментным методом с использованием магнитосорбентов (И.П. Гонтарь и соавт., 2002 г.) [10]. Благодаря научным изысканиям в иммунодиагностике ревматических заболеваний было выявлено, что именно иммуноферментные методы анализа (ИФА) с применением магнитоуправляемых сорбентов приводят к повышению стабильности иммобилизованного антигена. Именно за счет иммобилизации биологически активных веществ в поверхностном слое гранулы происходит повышение концентрации данного антигена в реакционной зоне, что приводит к увеличению чувствительности данного метода. За счет включения магнитного материала в гранулы происходит ускорение всех манипуляций исследования, а это, в свою очередь, улучшает качественные характеристики проведенных исследований.

Обработка полученных данных проводилась с применением программного пакета Statistica 6,0 for Windows. Выборочные характеристики выражались как среднее значение ( $M$ ) и стандартное отклонение ( $\sigma$ ). Полученные результаты оценивали в единицах

оптической плотности (е.о.п.) и считали положительными при превышении величин экстинкции, найденных для здоровых лиц, более чем на  $2\sigma$ . Связь между количественными признаками определяли методом корреляционного анализа. Полученные результаты оценивались с помощью величины  $p$  ( $p$ -value) – вероятности того, что получаемый в исследовании эффект носит случайный характер. Значение  $p < 0,05$  было принято условием статистической значимости различий значений.

### Результаты исследования и их обсуждение

В результате исследований была определена средняя концентрация АТ к ГР в донорских сыворотках, которая по данным иммуноферментного анализа составила  $0,080 \pm 0,004$  е.о.п. Показатели, которые превышали эти значения на величину 2 стандартных отклонений, были приняты за верхнюю границу нормы: для АТ к ГР –  $0,124$  е.о.п. Общая активность ГР составила  $114,3 \pm 3,7$  МЕ, амплитуда колебаний величины активности –  $73,4$ – $154,0$  МЕ. При исследовании больных ССД были выявлены достоверное уменьшение энзиматической активности фермента и увеличение количества антител к глутатионредуктазе по сравнению с донорами ( $p < 0,001$ ) (табл. 1).

Таблица 1

Активность ГР и антитела к ней у больных системной склеродермией в зависимости от активности заболевания

Группа	Больные n	Активность ГР, Ед/мл ( $M \pm m$ )	АТ к ГР, е.о.п. ( $M \pm m$ )
Здоровые Доноры	30	$114,3 \pm 3,7$	$0,080 \pm 0,004$
Больные ССД, I степень активности	20	$86,4 \pm 3,6$	$0,132 \pm 0,004$
II–III степени активности	25	$63,2 \pm 3,1$	$0,184 \pm 0,003$

Снижение биохимической активности ГР, очевидно, связано с образованием специфических антител к энзиму в результате изменения стереометрии молекулы фермента и блокады его активных центров, которое и запускает основной биохимический механизм окисления свободных радикалов. Именно взаимодействие фермента с АФК и продуктами свободнорадикальных процессов, очевидно, и изменяет стереометрию молекулы энзима, что и приводит к экспрессии скрытых антигенных детерминант глутатионредуктазы, в связи с чем она и приобретает свойства аутоантигена. Анализ количества антител к глутатионредуктазе выявил тесную взаимосвязь с активностью системной склеродермии. Умеренная и высокая активность превышала значения у пациентов с низкой активностью заболевания, и она была достоверно выше значения здоровых лиц ( $p < 0,001$ ). Рост

содержания специфических аутоантител и снижение активности фермента в крови больных ССД происходили с повышением активности склеродермического процесса, что соответствовало минимальной и умеренно-максимальной степени активности заболевания ( $p < 0,001$ ). Перед выпиской из стационара у больных системной склеродермией на фоне улучшения клинико-лабораторных показателей происходило увеличение активности исследуемого фермента. Это было связано с уменьшением активности склеродермического процесса на фоне проводимой иммуносупрессивной терапии с включением плазмафереза, при этом отмечалось и уменьшение количества специфических аутоантител.

Одним из основных факторов, определяющих прогноз ССД, является характер течения склеродермического процесса. У больных со ССД с хроническим течением при поступлении в стационар было выявлено повышение уровня антител к изучаемому ферменту по сравнению с донорами. У больных с подострым и острым течением заболевания при поступлении в стационар уровень антител к глутатионредуктазе значительно превосходил аналогичные показатели доноров ( $p < 0,001$ ) и больных с хроническим вариантом течения ССД ( $p < 0,05$ ). Статистически значимых различий при определении ферментативной активности ГР у больных ССД в зависимости от течения заболевания выявлено не было (табл. 2).

Таблица 2

Активность ГР и антитела к ней у больных ССД в зависимости от течения заболевания

Течение	Больные n	Время обследования	Активность ГР, Ед/мг ( $M \pm m$ )	АТ к ГР, е.о.п. ( $M \pm m$ )
Хроническое	20	До лечения	112 $\pm$ 2,8	0,136* $\pm$ 0,008
		После лечения	115,7 $\pm$ 2,6	0,096 $\pm$ 0,06
Подострое и острое	25	До лечения	70,3* $\pm$ 2,5	0,178* $\# \pm$ 0,116
		После лечения	98,2 $\pm$ 1,7	0,112 $\pm$ 0,009

\* –  $p < 0,001$  (с донорами)

# –  $p < 0,05$  ( между клиническими группами)

Нами было проведено исследование влияния стадии заболевания на содержание антител к ГР у больных системной склеродермией (табл. 3).

Таблица 3

Содержание антител к ГР у больных ССД в зависимости от стадии заболевания

Показатель	I стадия	II стадия	III стадия
Количество больных	10	29	6
АТ к ГР, е.о.п. ( $M \pm m$ )	0,124 $\pm$ 0,022	0,162 $\pm$ 0,017	0,324 $\pm$ 0,024*

\* –  $p < 0,05$

Была выявлена зависимость уровня антител от стадии заболевания. После проведенного лечения у больных ССД отмечалось снижение концентрации сывороточных

АТ к ГР ( $p < 0,001$ ). Достоверных изменений активности ГР на различных стадиях системной склеродермии выявлено не было.

Была проанализирована взаимосвязь различных клинических проявлений у больных ССД с наличием антител к глутатионредуктазе. Результаты исследований показали достоверное повышение антител к ГР у больных ССД с поражением различных органов и систем во всех клинических группах, но наиболее высокий уровень исследуемых антител наблюдался у пациентов с поражением сердца и легких ( $p < 0,001$ ). Кардиальная патология по типу ИБС и некоронарогенного кардиосклероза была выявлена у 25 положительных по АТ к ГР, поражение легких – у 20 пациентов (табл. 4).

Таблица 4.

Уровень антител к ГР у больных ССД в зависимости от клинических проявлений заболевания

Группы	Больные n	До лечения АТ к ГР, е.о.п. М (m)	После лечения АТ к ГР е.о.п. М (m)
Поражение кожи	45	0,156 (0,024)	0,108* (0,028)
Поражение костно-мышечной системы	45	0,110 (0,004)	0,086*(0,009)
Поражение сердца	25	0,129 (0,004)	0,102* (0,004)
Поражение легких	35	0,118 (0,008)	0,074* (0,007)
Синдром Рейно	32	0,086 (0,004)	0,072 (0,004)
Поражение ЖКТ	33	0,085 (0,014)	0,076 (0,07)
Поражение нервной системы	12	0,094 (0,006)	0,069 (0,004)

\* –  $p < 0,05$

Уменьшение ферментативной активности глутатионредуктазы приводит к появлению сердечно-сосудистых заболеваний, а образующиеся антитела к глутатионредуктазе, в свою очередь, резко снижают антиоксидантную активность этого фермента и еще больше усугубляют атеросклеротический процесс. Отсюда следует, что в патогенезе ишемии при системной склеродермии большую роль играют и иммунные механизмы, связанные с выработкой АТ к ГР.

Высокий уровень АТ к ГР и низкая ферментативная активность фермента приводят к поражению легочной ткани. Выявлено, что при склеродермическом процессе происходит развитие фиброзирующего альвеолита и интерстициального фиброза за счет иммунных нарушений, которые возникают вследствие увеличения свободнорадикальных реакций и процессов фиброгенеза.

Динамическое изучение показателей содержания АТ к ГР в крови больных склеродермическим процессом позволило установить, что к концу пребывания пациентов в

стационаре происходило достоверное их снижение ( $p < 0,001$ ) и увеличение активности фермента. При изучении вида проводимой терапии на содержание антител к глутатионредуктазе в крови больных ССД было выявлено, что наиболее выраженный эффект лечения наблюдался у пациентов с применением плазмафереза в сочетании с глюкокортикостероидными препаратами, отмечалась отчетливая тенденция к уменьшению количества антител к ГР ( $p < 0,05$ ); перед выпиской из стационара уровень антител к ГР был на уровне границы нормы (табл. 5).

Таблица 5

Динамика активности ГР и антител к глутатионредуктазе в процессе лечения.

Больные (n)	Показатель	При поступлении	При выписке
Все больные ССД (n=45)	Активность ГР, мкГР/мл Уровень АТ к ГЛ е.о.п.	64,2±1,16 0,175±0,008	67,3±1,18 0,105±0,010
Лечение цитотоксическими препаратами в комбинации с кортикостероидами (n=10)	Активность ГР, мкГР/мл Уровень АТ к ГР е.о.п.	63,9±1,8 0,184*±0,011	79,6±0,34 0,106±0,008
Комплексная терапия с включением плазмафереза (n=15)	Активность ГР, мкГЛ/мл Уровень АТ к ГР, е.о.п.	62,1±0,42 0,189*±0,006	78,1±0,32 0,092±0,008

\* $p < 0,05$

Включение в комплексное лечение больных склеродермией глюкокортикостероидных препаратов и экстракорпоральных методов, особенно плазмафереза, способствует снижению интенсивности антителогенеза и уменьшению активности склеродермического процесса.

### **Заключение**

Полученные нами результаты исследований – снижение ферментативной активности глутатионредуктазы, увеличение количества антител к ней – могут служить дополнительным диагностическим критерием при системной склеродермии. Образующиеся аутоантитела к ГР могут явиться одной из причин снижения антиоксидантной активности фермента, а изучение взаимосвязи изменений иммунологической системы и биохимической активности энзима может быть использовано для уточнения патогенетических механизмов развития болезни. Таким образом, данные проведенного исследования представляют несомненный интерес для дальнейшего изучения склеродермического процесса.

## Список литературы

1. Гусева Н.Г. Системная склеродермия: ранняя диагностика и прогноз // Научно-практическая ревматология. 2007. № 1. С. 39-45.
2. Гусева Н.Г. Системная склеродермия – мультидисциплинарная проблема // Научно-практическая ревматология. 2011. № 2. С. 10-14.
3. Юдкина И.Н., Волков А.В., Николаева Е.В., Насонов Е.Л. Вклад аутоиммунных и воспалительных нарушений в течение легочной артериальной гипертензии при системной склеродермии // Научно-практическая ревматология. 2019. Т. 57. № 3. С. 394-395.
4. Головач И.Ю., Егудина Е.Д. Системная склеродермия: современный взгляд на патогенез, клинику, диагностику и лечение // Семейная медицина. 2019. Т. 83. № 3. С. 7-16.
5. Калинина Е.В. Березов Т.Т., Чернов Н.Н., Саприн А.Н. Окислительный стресс и глутатион-зависимые процессы в развитии лекарственной устойчивости опухолевых клеток: монография. М.: Изд. Медпрактика-М, 2009. 167 с.
6. Зборовская И.А., Мозговая Е.Э., Трофименко А.С., Бедина С.А. Активность ферментов пуринового и пиримидинового метаболизма при системной склеродермии: энзимный профиль плазмы крови и лимфоцитов // Успехи физиологических наук. 2019. Т. 50. № 3. С. 83-91.
7. Sitar M.E., Aydin S., Cakatay U. Human serum albumin and its relation with oxidative stress. Clin. Lab. 2013. Vol. 59 (9-10). P. 945-952.
8. Шилова Л.Н., Гонтарь И.П., Зборовская И.А., Новикова О.В., Емельянов Н.Н. Клинико-патогенетическое значение наличия антител к ферментам антиоксидантной системы при синдроме Рейно // Клиническая медицина. 2010. Т. 88. № 2 С. 43-46.
9. Шилова Л.Н., Гонтарь И.П., Зборовская И.А., Новикова О.В., Емельянов Н.Н. Взаимосвязь между антителами к ферментам антиоксидантной системы и поражением сердца у больных системной склеродермией // Кардиология. 2010. Т. 50. № 12. С. 64-67.
10. Гонтарь И.П., Сычева Г.Ф., Александров А.В., Шилова Л.Н., Симакова Е.С., Емельянов Н.Н., Матасова Н.А., 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.