

УДК 616.72-002.772: 616.5-002.525.2: 616.5-004.1: 616-097

НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПОВЫШЕНИЯ КАЧЕСТВА РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ РЕВМАТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Александров А.В., Грехов Р.А., Шилова Л.Н., Алехина И.Ю.

Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии РАМН, Волгоград, e-mail: imlab@mail.ru

Для диагностики ранних симптомов ревматоидного артрита (РА), системной красной волчанки (СКВ) и системной склеродермии (ССД) были разработаны новые диагностические тесты с использованием иммобилизованных антигенных препаратов на основе ферментов антиоксидантной системы (АОС). Выявленные изменения активности ферментов и содержания антител к ним при РА, СКВ и ССД являются свидетельством интенсификации антиоксидантной защитной системы при хронических аутоиммунных заболеваниях. Определение антител к ферментам АОС может использоваться для диагностики степени активности РА, СКВ и ССД, а также для дополнительной оценки эффективности проводимой терапии.

Ключевые слова: ревматические заболевания, ферменты, антитела, антиоксидантная система организма

NEW POSSIBILITIES FOR IMPROVING OF QUALITY OF EARLY DIAGNOSTICS OF RHEUMATIC DISEASES

Alexandrov A.V., Grekhov R.A., Shilova L.N., Alekhina I.Y.

Research Institute for clinical and experimental rheumatology of the Russian Academy of Medical Sciences, Volgograd, e-mail: imlab@mail.ru

The new diagnostic tests using immobilized antigen preparations on the basis of antioxidant system (AOS) ferments are elaborated for diagnostics of early signs of rheumatoid arthritis (RA), system lupus erythematosus (SLE) and systemic sclerosis (SS). Revealed changes of the ferments' activities and the content of antibodies to them in RA, SLE and SS patients are the evidence of intensity of antioxidant protection' system in chronic autoimmune diseases. Determination of antibodies to ferments of AOS can be used for diagnostics of RA, SLE and SS activity, and as additional measure of the therapy efficiency also.

Keywords: rheumatic diseases, enzymes, antibodies, antioxidant system of organism

Из-за преимущественно хронического течения и склонности к неуклонному прогрессированию ревматические заболевания находятся на одном из первых мест среди причин ухудшения качества жизни, а также временной и стойкой нетрудоспособности, являясь тяжелым бременем, как для пациента, так и для всей системы здравоохранения [3]. В связи с этим наиболее актуальной становится проблема ранней диагностики начальных проявлений активации и прогрессирования патологического процесса у ревматических больных.

Целью работы явилась разработка дополнительных критериев иммунодиагностики ревматоидного артрита (РА), системной красной волчанки (СКВ) и системной склеродермии (ССД) с использованием иммобилизованных антигенных наносистем (АНС) на основе супероксиддисмутазы (СОД), церулоплазмينا (ЦП), ксантиноксидазы (КО) и каталазы (КАТ).

Материалы и методы исследования

Исследовалась сыворотка крови 30 практически здоровых лиц – доноров станции переливания крови (группа контроля), а также 86 больных РА, 46 больных СКВ и 40 больных ССД. Диагноз РА и СКВ ставился на основании критериев Американского колледжа ревматологов 1987 г. и 1982 г. соответственно. Диагностика ССД, определение степени активности, характера течения и стадии заболевания проводились

в соответствии с критериями АРА и отечественной классификацией (Н. Гусева, 1975).

Объектом исследований служила сыворотка крови. Ферментативную активность ЦП определяли по методике Ravin в модификации Тена (1981); активность плазменной СОД – по методу Дубининой Е.Е. и соавт. (1986); активность КО – по модифицированной методике Калькара (Дячина Е.Г., 1973); активность КАТ – по методу Королюк М.А. и соавт. (1988).

Антитела (АТ) к СОД, ЦП, КО и КАТ выявляли твердофазным иммуноферментным анализом в модификации Гонтаря И.П. и соавт. с использованием АНС, для получения которых применяли метод эмульсионной полимеризации в потоке газообразного азота с включением магнитного материала и соответствующей антигенной матрицы [2].

Результаты исследования и их обсуждение

Предварительно нами были определены условия получения АНС:

1) АНС создавались на основе 20%-го полиакриламидного геля и представляли собой гранулы сферической формы размером 10–100 мкм;

2) антигенную матрицу АНС формировали, используя водные растворы антигенов: оптимальная концентрация для СОД составила 1,4 мг/мл, для ЦП – 0,75 ммоль/л, для КО – 50 мкг/мл, для КАТ – 1,4 мкг/мл;

3) изучение влияния времени хранения на АНС с белковой матрицей показало, что

максимальное количество белка удаляется из полиакриламидных гранул на 2–3 суток хранения, а затем процесс резко замедляется; общее количество антигена, оставшееся в гранулах после 6 суток хранения, составило в среднем 96,8%, после 30 суток – 96,8%;

4) потери иммобилизованного антигена из АНС изучали при температуре +4, 20 и 37 °С; реальные потери белка при максимальной температуре составили 0,093%. По-видимому, на поверхности гранул АНС имеются молекулы антигена, частично включенные в пространственную решетку геля, а при хранении и воздействии разных температур полиакриламидный гель несколько набухает, что и приводит к потерям белка.

При исследовании сывороток крови здоровых лиц на содержание антител к ферментам антиоксидантной системы организма с помощью иммуноферментного метода на основе АНС были получены следующие результаты: уровень АТ к СОД ($M \pm m$) составил $0,06 \pm 0,004$ е.о.п., АТ к ЦП – $0,022 \pm 0,003$ е.о.п., АТ к КО – $0,032 \pm 0,002$ е.о.п. и АТ к КАТ – $0,067 \pm 0,004$ е.о.п. Ферментативная активность СОД в контрольной группе составила $40 \pm 2,5$ ед., ЦП – $1,087 \pm 0,249$ ед., КО – $3,67 \pm 0,12$ ед., КАТ – $22,6 \pm 1,6$ ед.

Ревматоидный артрит

При РА наблюдалось повышение ферментативной активности ЦП и КО ($p = 0,035$), снижение активности СОД и КАТ ($p = 0,008$). АТ к ЦП выявлены

у 59,3 % больных РА, АТ к КО – у 47,7 % больных, АТ к СОД – у 65,1 % больных и АТ к КАТ – у 61,6 % больных РА.

У больных с I степенью активности РА при поступлении на стационарное лечение отмечалось повышение активности СОД ($p = 0,12$), ЦП ($p = 0,007$), КО ($p < 0,001$) и уменьшение активности КАТ ($p = 0,004$), а также увеличение содержания АТ к ЦП ($p = 0,009$), КАТ ($p = 0,028$) и СОД ($p = 0,24$). У больных РА со II степенью активности патологического процесса отмечено снижение активности СОД и КАТ ($p = 0,039$ и $p = 0,042$, соответственно) и увеличение содержания АТ к ним ($p = 0,008$ и $p = 0,025$ соответственно). Содержание АТ к ЦП и КО было в 1,5–2 раза выше уровня АТ при минимальной активности патологического процесса ($p = 0,042$), ферментативная активность ЦП ($p > 0,05$) и КО ($p = 0,007$) также возрастала. При III степени активности заболевания по сравнению с показателями больных РА с активностью II наблюдалось увеличение содержания АТ к СОД ($p = 0,009$), КО и КАТ ($p > 0,05$) и незначительное снижение уровня АТ к ЦП ($p > 0,05$), на фоне повышения активности ЦП ($p = 0,004$), СОД ($p > 0,05$) и уменьшения активности КАТ ($p = 0,006$) (табл. 1).

В результате проведенного в условиях стационара лечения у больных РА отмечалось повышение активности СОД ($p = 0,029$), КАТ ($p = 0,025$), снижение активности ЦП ($p > 0,05$), КО ($p = 0,008$) и уменьшение уровня антител к СОД ($p = 0,033$), КО ($p = 0,007$), ЦП и КАТ ($p > 0,05$).

Таблица 1

Показатели содержания антител к СОД, ЦП, КО, КАТ в зависимости от активности патологического процесса ($M \pm SD$)

Контингент обследуемых	N	Антитела к СОД	Антитела к ЦП	Антитела к КО	Антитела к КАТ
Здоровые	30	$0,06 \pm 0,022$	$0,022 \pm 0,014$	$0,032 \pm 0,013$	$0,067 \pm 0,019$
<i>Активность ревматоидного артрита</i>					
I степень	16	$0,078 \pm 0,018$	$0,094 \pm 0,052$	$0,054 \pm 0,029$	$0,089 \pm 0,034$
II степень	62	$0,144 \pm 0,049$	$0,162 \pm 0,054$	$0,112 \pm 0,044$	$0,119 \pm 0,048$
III степень	8	$0,207 \pm 0,022$	$0,149 \pm 0,063$	$0,211 \pm 0,019$	$0,141 \pm 0,076$
<i>Активность системной красной волчанки</i>					
Минимальная	16	$0,062 \pm 0,021$	$0,088 \pm 0,039$	$0,067 \pm 0,034$	$0,092 \pm 0,037$
Умеренная	27	$0,161 \pm 0,034$	$0,133 \pm 0,056$	$0,099 \pm 0,046$	$0,142 \pm 0,045$
Высокая	3	$0,219 \pm 0,048$	$0,157 \pm 0,060$	$0,197 \pm 0,039$	$0,212 \pm 0,067$
<i>Активность системной склеродермии</i>					
Минимальная	16	$0,045 \pm 0,027$	$0,061 \pm 0,023$	$0,037 \pm 0,019$	$0,071 \pm 0,032$
Умеренная	24	$0,126 \pm 0,033$	$0,084 \pm 0,026$	$0,062 \pm 0,022$	$0,099 \pm 0,018$

Примечание: N – количество больных, SD – стандартное отклонение.

РА нередко сопровождается анемией, которая коррелирует не столько с длительностью болезни, сколько со

степенью ее клинической активности (лихорадкой, количеством пораженных суставов, интенсивностью синовитов и дру-

гими проявлениями). Все больные РА были разделены в зависимости от уровня гемоглобина и количества эритроцитов на три группы: I группа – без анемии (57 человек);

II группа – с анемией, $90 \text{ г/л} < \text{Hb} < 115 \text{ г/л}$ (19 человек); III группа – с выраженной анемией, $\text{Hb} < 90 \text{ г/л}$ (12 человек) (табл. 2).

Таблица 2

Уровни антител к СОД, КАТ и ЦП у больных РА с различным содержанием гемоглобина

Контингент обследуемых	N	Антитела к СОД, М (SD)	Антитела к КАТ, М (SD)	Антитела к ЦП, М (SD)
Здоровые	30	0,060 (0,022)	0,067 (0,019)	0,022 (0,014)
Больные РА без анемии	57	0,112 (0,044)	0,103 (0,033)	0,120 (0,040)
Больные с $90 \text{ г/л} < \text{Hb} < 115 \text{ г/л}$	19	0,153 (0,037)	0,136 (0,029)	0,158 (0,013)
Больные с $\text{Hb} < 90 \text{ г/л}$	12	0,178 (0,028)	0,157 (0,014)	0,170 (0,025)

Примечание: N – количество больных, SD – стандартное отклонение.

При поступлении в стационар у 31 (36%) человека диагностированы явления анемии различной степени. Эта группа больных имела достоверные различия в содержании АТ к СОД, КАТ и ЦП по сравнению с пациентами без анемии ($p < 0,001$). В содержании АТ к КО у больных РА с различным уровнем гемоглобина различий не выявлено ($p > 0,05$).

Учитывая, что иммунологические изменения, происходящие в организме, тесно связаны с биохимическими процессами, было проведено изучение влияния выраженности антителогенеза к изучаемым ферментам на активность СОД, КАТ и ЦП у больных РА с различным уровнем гемоглобина. Ферментативная активность СОД была существенно снижена в III группе и достоверно отличалась от показателей больных РА с уровнем $\text{Hb} < 115 \text{ г/л}$ и $> 90 \text{ г/л}$ (II группа) ($p = 0,0002$). Статистически значимых различий между I и II группой в определении активности СОД выявлено не было ($p = 0,320$) (в I группе активность СОД – $4,76 \pm 1,71$, во II группе – $4,44 \pm 1,79$ и в III группе – $2,83 \pm 1,12$).

Также было отмечено угнетение ферментативной активности каталазы практически у всех больных РА, причем с нарастанием явлений анемии снижение активности фермента более выражено (в I группе активность КАТ – $9,62 \pm 2,71$, во II группе – $6,47 \pm 1,78$ и в III группе – $4,51 \pm 0,96$).

Известная стимулирующая роль ЦП на кроветворение подтолкнула нас к изучению зависимости между интенсивностью антителогенеза, содержанием ЦП с одной стороны, и выраженностью анемии – с другой. У больных I и II групп найдены достоверные отличия по уровню АТ к ЦП ($p = 0,006$), содержанию ферментативно-активного (1021 ± 329 и 1198 ± 499 , $p = 0,013$) и иммунореактивного ЦП (1405 ± 492 и 1640 ± 704 , $p = 0,023$). Изучаемые показа-

тели в III группе были выше, чем во второй, но эти различия недостоверны ($p > 0,05$).

Таким образом, более высокий уровень антител к ферментам АОС наблюдается у больных с наличием внесуставных проявлений, особенно при развитии анемии, свидетельствуя о тяжести заболевания.

Системная красная волчанка

При СКВ имело место повышение ферментативной активности ЦП (менее выраженное, чем при РА, $p = 0,048$), снижение активности КАТ ($p = 0,009$), отмечена тенденция к росту активности КО ($p > 0,05$). Антитела к ЦП выявлены у 48% больных СКВ, антитела к КАТ – у 52,2% больных, АТ к СОД – у 39,9% больных и АТ к КО – у 41,3% больных. Следует отметить, что динамика показателей ферментативной активности и уровней антител к изучаемым ферментам у больных СКВ в зависимости от активности патологического процесса имела схожие черты с процессами, наблюдаемыми при РА (снижение активности СОД, $p = 0,028$ и КАТ, $p = 0,019$; на фоне роста уровня АТ к данным ферментам, $p < 0,001$) (см. табл. 1).

Однако имелись и особенности, так, например, в группе больных СКВ с наличием АТ к ЦП активность ЦП была существенно ниже, чем у больных без данных антител ($p < 0,001$). Интересные результаты были получены в ходе динамического наблюдения за больными. При выписке из стационара отмечалось некоторое снижение активности ЦП в группе больных без антител к ЦП. Однако в группе больных с наличием антител к ферменту активность ЦП не только не снижалась, а повышалась ($p = 0,037$). Уровень АТ к ЦП на фоне лечения имел тенденцию к снижению ($p > 0,05$). В группе больных СКВ с наличием АТ к КО отмечено увеличение активности фермента в сыроворотке крови ($p = 0,041$), причем стандарт-

ная терапия оказывала слабое воздействие на нормализацию иммуно-биохимических сдвигов.

Системная склеродермия

Фиброзирование и нарушение микроциркуляции, приводящие к развитию ишемии и кардиосклероза, являются основой развития одного из ведущих висцеральных проявлений при ССД – поражения сердца. У 21 (52,5%) больного ССД отмечалось поражение сердца.

Для раннего выявления сердечно-сосудистых осложнений при ССД наиболее эффективным оказалось определение антител к СОД. Данные антитела выявлялись в 40% случаев. При минимальной степени активности патологического процесса (16 человек) высокие уровни АТ к СОД были выявлены у 6 (37,5%) больных. С увеличением степени активности заболевания достоверные изменения отмечены при определении уровня АТ к СОД ($p < 0,001$) (табл.1). У больных ССД с поражением сердечно-сосудистой системы отмечены наиболее высокие уровни антител к СОД ($\chi^2 = 4,58$; $p = 0,032$) и каталазе ($\chi^2 = 3,57$; $p = 0,048$).

Больным ССД была проведена капилляроскопия сосудов ногтевого ложа, по результатам которой были выявлены характерные изменения: у 22 пациентов (55%) – значительные нарушения (уменьшение количества капилляров, их деформация, наличие нескольких аваскулярных зон), у 10 (25%) умеренные, у 8 (10%) – невыраженные. Кроме того, все больные с высоким содержанием антител к СОД имели высокую (II–IV) степень синдрома Рейно, сопровождающегося выраженной ишемией и, следовательно, гипоксией тканей, в результате чего отмечается усиление пероксидации мембранных структур и апоптоза клеток [1].

Таким образом, иммунные механизмы оказывают существенное влияние на выраженность реакций свободнорадикального окисления при ревматических заболеваниях. Активные формы кислорода могут оказывать патогенное воздействие на биомоле-

кулы и структуры клетки непосредственно, либо инициируя процессы перекисного окисления липидов, приводя к повреждению белков, липидов, нуклеиновых кислот и придавая им свойства аутоантигенов. Образование аутоантител к таким структурам является ключевым звеном патогенеза системных ревматических заболеваний и происходит задолго до развития выраженных клинических проявлений [4, 5].

Выводы

Показатели ферментативной активности и содержания антител к ферментам-прооксидантам (КО) и ферментам антиоксидантной защиты организма (ЦП, СОД и КАТ) могут использоваться в диагностике ранних клинических проявлений РА, СКВ и ССД, а также в качестве дополнительного критерия оценки эффективности проводимой терапии.

Список литературы

1. Алекперов Р.Т., Старовойтова М.Н. Синдром Рейно в практике терапевта // Русский медицинский журнал. – 2010. – № 27. – С. 1695–1698.
2. Эмульсионная полимеризация как метод, модифицирующий ферменты с сохранением биологических свойств их наноструктур / И.П. Гонтарь, Г.Ф. Сычева, А.В. Александров и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – № 12. – С. 715–719.
3. Фоломеева О.М., Эрдес Ш.Ф., Насонова В.А. Ревматические заболевания у населения Российской Федерации в начале XXI века // Тер. архив. – 2007. – № 12. – С. 5–12.
4. Gordon C., Salmon M. Update on systemic lupus erythematosus: autoanti-bodies and apoptosis // Clin. Med. – 2001. – Vol.1, №1. – P. 10–14.
5. Su W., Madaio M.P. Recent advances in the pathogenesis of lupus nephritis: autoantibodies and B cells // Semin. Nephrol. – 2003. – Vol. 23, № 6. – P. 564–568.

Рецензенты:

Краюшкин С.И., д.м.н., профессор, зав. кафедрой амбулаторной и скорой медицинской помощи ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздравразвития, г. Волгоград;

Борис Ф.Н., д.м.н., профессор, зав. кафедрой госпитальной терапии ВБОУ ВПО «Кировская ГМА» Минздравсоцразвития России, г. Киров.

Работа поступила в редакцию 29.09.2011.