

УДК 616.5-002.525.2: 577.15: 616-097

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ АНТИТЕЛ К ГУАНИНДЕЗАМИНАЗЕ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ПРИ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКЕ

**Зборовская И.А., Алехина И.Ю., Курбанова Р.Д., Александрова Н.В.,
Емельянова О.И., Александров А.В.**

*ФГБУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной
ревматологии» РАМН, Волгоград, e-mail: imlab@mail.ru*

Расширение спектра иммунологических методов диагностики системных ревматических заболеваний может быть обеспечено внедрением в лабораторную практику иммуноферментного метода на основе иммобилизованных ферментов. Изучалось клинко-патогенетическое значение антител к гуаниндезаминазе у 60 больных системной красной волчанкой (СКВ). Обнаружена связь между уровнем антител к гуаниндезаминазе в сыворотке крови больных СКВ и степенью активности патологического процесса. Предположительно, антитела к гуаниндезаминазе могут входить в состав циркулирующих иммунных комплексов, что может приводить к повышению их уровня у больных СКВ. Внедрение инновационных методов лабораторной диагностики может быть использовано для выявления антител к ферментам в сыворотке крови больных СКВ, что позволит более точно судить об активности патологического процесса и даст дополнительные возможности для своевременной коррекции терапевтического воздействия.

Ключевые слова: системная красная волчанка, гуаниндезаминаза, антитела

CLINICODIAGNOSTIC VALUE OF ANTIBODIES TO GUANIN DEAMINASE FOR ASCERTAINMENT THE ACTIVITY OF PATHOLOGICAL PROCESS IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

**Zborovskaya I.A., Alekhina I.Y., Kurbanova R.D., Aleksandrova N.V.,
Emelianova O.I., Aleksandrov A.V.**

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

Expansion of spectrum of immunologic methods for diagnostics of systemic rheumatic diseases can be provided by introduction in laboratory practice of immunoenzyme method on a basis of immobilized antigens. We examined the clinical and pathogenetic significance of antibodies to guanine deaminase of 60 patients with systemic lupus erythematosus (SLE). The connection between the level of antibodies to guanine deaminase in serum of patients with SLE and the degree of activity of the pathological process was found. Supposedly guanine deaminase antibody can comprise circulating immune complexes, which can increase their level of SLE patients. The introduction of innovative methods for laboratory diagnostics can be used to detect antibodies to the enzymes in the serum of patients with SLE. These methods will help to establish the activity of the pathological process and provide additional opportunities for the timely correction of therapeutic treatment.

Keywords: system lupus erythematosus, guanine deaminase, antibodies

Системная красная волчанка (СКВ) является заболеванием, развивающимся на основе генетически обусловленного несовершенства иммунорегуляторных процессов, приводящего к возникновению иммунокомплексного воспаления и образованию широкого спектра аутоантител, которые могут быть ответственны за многие клинические проявления, имеющие важное значение в диагностике [3, 4].

Среди множества антител основная роль в развитии и поддержании патологического процесса при СКВ принадлежит антителам к ДНК, образующим с антигенами циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК). В настоящее время основными кандидатами на роль аутоантигена считаются нуклеосомы – комплексы ДНК с гистонами. Предположительно в основе патогенеза СКВ лежит генетически обусловленный

дефект апоптоза («запрограммированной клеточной смерти»), способствующий высвобождению нуклеосом из клеток, персистенции и экспансии аутореактивных клонов Т- и В-клеток, приводящих к активации поликлональных В-лимфоцитов и формированию Т-зависимого иммунного ответа на аутоантигены. Контроль апоптоза имеет решающее значение для гомеостаза иммунной системы, а его дефекты играют определенную роль в индукции аутоиммунных заболеваний.

Предполагается, что запрограммированная гибель мононуклеаров является одним из механизмов, приводящих к появлению аутоантигенов и усилению их иммуногенности. Увеличение скорости апоптоза лимфоцитов у больных СКВ было продемонстрировано как *in vivo* (в периферической крови), так и *in vitro* [7, 10], причем было

отмечено, что данный процесс может сопровождаться возрастанием экскреции из клеток деградированной ДНК, нуклеосом, гистонов, компонентов комплекса Гольджи и митохондрий, а также модификацией и перемещением внутриклеточных макромолекул на поверхность мембраноассоциированных фрагментов (апоптотических тел). Следовательно, апоптотические клетки «поставляют» ранее скрытые аутоантигены, которые активируют аутореактивные лимфоциты, способствуют образованию аутоантител и формируют с ними активированные комплексы, откладывающиеся на базальных мембранах. Причем характерный для СКВ широкий спектр аутоантител обусловлен многообразием аутоантигенов, модифицированных и освобожденных в ходе апоптоза [12, 14].

В последнее время особый интерес вызывает тот факт, что достаточно часто мишенью аутоиммунных реакций становятся ферменты основных метаболических путей организма, к которым вырабатываются специфические антитела и их можно определить в сыворотке больных, используя современные высокочувствительные методы лабораторного анализа.

Гуаниндезаминаза (гуанинаминогидралаза, гуаназа, ГДА, Е.С. 3.5.4.3) – один из основных ферментов пуринового метаболизма, относится к группе гидролаз, действует на C–N-связи в структуре N–CH–N циклических аминов и катализирует гидролитическое дезаминирование гуанина с образованием ксантина и аммиака. ГДА сосредоточена в гепатоцитах и железистых клетках, выстилающих внутреннюю поверхность желчного пузыря, островках Лангерганса поджелудочной железы, клетках почечных канальцев и в меньшей степени присутствует в нервных клетках коры головного мозга, бокового желудочка и гипоталамуса [13]. Активность гуаниндезаминазы в сыворотке крови человека является в первую очередь индикатором гепатоклеточных повреждений: появление активности фермента в сыворотке крови связано с нарушением функции печени.

Цель исследования: совершенствование методов иммунодиагностики СКВ с помощью иммобилизованных магнитоуправляемых антигенных наносистем (АНС) на основе гуаниндезаминазы.

Материалы и методы исследования

Критерии включения больных СКВ в исследование: возраст 18 лет (включительно) и старше; наличие информированного согласия; наличие у больного диагноза СКВ, соответствующего диагностическим критериям; срок, прошедший после установления диагноза, – не менее 6 месяцев.

Критерии исключения больных СКВ из исследования: беременность или лактация; алкогольная и (или) наркотическая зависимость; инфицирование вирусом иммунодефицита человека или возбудителями вирусных гепатитов В и С; наличие на момент отбора злокачественного новообразования любой локализации; тяжелая сопутствующая патология (сахарный диабет 1 или 2 типа, хроническая сердечная недостаточность 3, 4 функционального класса, хроническая почечная недостаточность в терминальной стадии, дыхательная недостаточность 2, 3 степени), требующая активного лечения.

Была сформирована группа больных СКВ численностью 60 человек, полностью соответствующая представленным критериям. Средний возраст больных СКВ составил $36,32 \pm 15,27$ ($M \pm SD$) лет, среди больных СКВ преобладали женщины (91,7%), абсолютное 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 оценивалась с помощью индексов SLEDAI (исходный показатель, $M \pm SD$: $8,9 \pm 5,7$; 95% доверительный интервал для M – $7,5 \dots 10,4$) и ECLAM (исходный показатель, $M \pm SD$: $5,3 \pm 2,8$; 95% доверительный интервал для M – $4,6 \dots 6,0$), а также по критериям, предложенным В.А. Насоновой (1985 г.): низкая – 9, умеренная – 34, высокая – 17 человек. Повреждение (необратимые изменения в состоянии здоровья) измерялось с помощью индекса SLICC/ACR (исходный показатель, $M \pm SD$: $1,9 \pm 1,7$; 95% доверительный интервал для M – $1,5 \dots 2,4$).

Контрольную группу составили 30 практически здоровых лиц (17 женщин и 13 мужчин в возрасте от 25 до 47 лет).

Антитела к ГДА (анти-ГДА) определяли в сыворотке крови по модифицированной методике иммуноферментного анализа с использованием иммобилизованных магнитоуправляемых антигенных наносистем (АНС). В качестве антигена использовался коммерческий препарат ГДА («Sigma», США). Иммобилизацию проводили методом эмульсионной полимеризации в потоке газообразного азота с включением магнитного материала в структуру полиакриламидного геля (Гонтарь И.П., 2002). Результаты 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) не менее чем на 2 стандартных отклонения.

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 $p < 0,05$ [5].

Результаты исследования и их обсуждение

При поступлении на стационарное лечение у больных СКВ (60 человек) показатели уровня антител к ГДА ($M \pm SD$) составили $1,272 \pm 0,817$ ед. (95% доверительный ин-

тервал для $M = 7,5 \dots 10,4$). У больных СКВ по сравнению со здоровыми лицами было обнаружено увеличение содержания антител к ГДА ($p < 0,001$; дисперсионный анализ в варианте с неравными дисперсиями). Количество больных СКВ с повышенным уровнем антител к ГДА составило 52%. Повышенный уровень антител к ГДА не был выявлен ни у одного обследованного в контрольной группе.

Была выявлена статистически значимая корреляция между уровнем антител к ГДА в сыворотке крови больных СКВ и актив-

ностью патологического процесса (индекс SLEDAI: $r = 0,361$, $p = 0,012$; индекс ECLAM: $r = 0,333$, $p = 0,011$). У больных с низкой активностью СКВ антитела к ГДА выявлялись в 22,2% случаев, в то время как у больных с умеренной активностью – у 41,2%, а при высокой активности – у 88,2% больных СКВ. Данное обстоятельство предполагает возможность использования показателей уровня антител к ГДА в качестве дополнительного лабораторного маркера активности патологического процесса при СКВ (таблица).

Содержание антител к ГДА в зависимости от активности СКВ (M; SD)

Параметр	Доноры ($n = 30$)	Активность СКВ		
		Низкая ($n = 9$)	Умеренная ($n = 34$)	Высокая ($n = 17$)
Уровень антител к ГДА (ед.)	0,032 (0,022)	0,069 (0,028)	0,112 (0,063)	0,171 (0,095)

Уровень антител к ГДА у больных с умеренной и высокой активностью был значительно выше, чем у больных с низкой активностью СКВ. При дальнейшем сравнении групп между собой были выявлены статистически значимые различия в содержании антител к ГДА между контрольной группой и больными СКВ с высокой активностью ($p < 0,001$; критерий Даннета), а также между контрольной группой и больными СКВ с умеренной активностью патологического процесса ($p = 0,017$; критерий Даннета).

Выявление различий между группами больных с различной активностью СКВ по наличию/отсутствию антител к ГДА (Критерий Крускала–Уоллиса) позволило провести последующие множественные сравнения между данными группами (критерий Даннета). Сравнение больных с различной активностью СКВ, позитивных по антителам к ГДА, продемонстрировало следующие статистически значимые различия: между больными с минимальной и умеренной активностью СКВ ($p = 0,039$), минимальной и высокой активностью болезни ($p = 0,034$).

Анализ корреляционных связей антител к ГДА с лабораторными показателями у больных СКВ с минимальной активностью патологического процесса показал достоверную связь умеренной силы с уровнем СОЭ ($r = 0,456$, $p = 0,032$) и лейкоцитурией ($r = 0,512$, $p = 0,029$). Перед выпиской из стационара содержание антител к ГДА снизилось ($F = 15,6$; $p < 0,0001$), но оставалось достоверно выше уровня здоровых лиц ($p < 0,001$).

У больных с умеренной активностью СКВ была обнаружена корреляция наличия антител к ГДА с уровнем ЦИК

($r = 0,684$, $p = 0,023$), уровнем антител к нативной ДНК ($r = 0,677$, $p = 0,017$), уровнем антител к денатурированной ДНК ($r = 0,402$, $p = 0,038$). Предположительно, антитела к ГДА могут входить в состав циркулирующих иммунных комплексов, что наряду с вовлечением других компонентов в иммунные комплексы может приводить к повышению их уровня у больных СКВ.

После проведенного лечения у больных СКВ с умеренной активностью заболевания отмечена существенная динамика показателей содержания антител к ГДА ($F = 81,3$; $p < 0,001$). Содержание изучаемых антител в сыворотке крови больных СКВ данной группы после лечения оставалось достоверно высоким по сравнению с группой доноров ($F = 75,5$, $p < 0,001$).

У больных СКВ с высокой активностью патологического процесса уровень антител к ГДА статистически значимо отличался от больных с минимальной активностью ($p = 0,008$, критерий Даннета) и был сопоставим с уровнем антител у больных с умеренной активностью заболевания ($p = 0,281$). У больных СКВ данной группы по окончании курса стационарного лечения (по сравнению с поступлением) отмечено достоверное снижение показателей содержания антител к ГДА ($p < 0,001$).

Кроме того, в группе больных СКВ 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, $p = 0,009$).

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. 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 [9].

Одной из возможных причин конформационных изменений структуры белка могут явиться активные формы кислорода (АФК) и усиление перекисного окисления липидов (ПОЛ). Общеизвестно, что при СКВ имеет место накопление АФК, вторичных свободнорадикальных продуктов, которые активно реагируют с молекулами в ближайшем окружении [8], 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 [6] и нейтрофилов [11], причем снижение уровня апоптоза нейтрофилов сопровождается усилением образования активных форм кислорода и уменьшением резервного потенциала клеток [2]. 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 [1], а также способствует выходу в экстрацеллюлярное пространство многих биологически активных веществ, в том числе и ферментов. Наличие антигенных свойств у ферментов обеспечивает ответную реакцию при их выходе из клетки, а воздействие различных факторов воспаления усиливает антигенные свойства энзимов вследствие возможного окисления их функциональных групп. Поэтому становится понятной выявленная нами положительная корреляционная связь между активностью СКВ и уровнем антителогенеза к ГДА.

Заключение

Механизмы образования аутоантител при таких заболеваниях, как СКВ, до сих пор не определены. Внедрение инновационных методов лабораторной диагностики на основе АНС может быть использовано для выявления антител к ферментам, в том числе и к ГДА, в сыворотке крови больных СКВ, что позволит более точно судить об активности патологического процесса и даст дополнительные возможности для своевременной коррекции терапевтического воздействия.

Список литературы

1. 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.
2. 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.
3. Насонов Е.Л. Клинические рекомендации. Ревматология / под ред. Е.Л. Насонова. – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2010. – 288 с.
4. Ревматология: национальное руководство / под ред. Е.Л. Насонова, В.А. Насоновой. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 720 с.
5. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – М.: МедиаСфера, 2006. – 312 с.
6. Романова Н.В. Окислительный стресс циркулирующих фагоцитов и поражения органов и систем при системной красной волчанке // Фундаментальные исследования. – 2005. – № 2. – С. 34.
7. Сорока Н.Ф. Апоптоз лимфоцитов периферической крови у больных системной красной волчанкой: патогенетические и клинические аспекты / Н.Ф. Сорока, А.И. Свириновский, А.Л. Рекун // Научно-практическая ревматология. – 2006. – № 4. – С. 44–52.
8. Ahsan H. Oxygen free radicals and systemic autoimmunity / H. Ahsan, A. Ali, R. Ali // Clin. Exp. Immunol. – 2003. – Vol. 131, № 3. – P. 398–404.
9. Deshmukh U.S. Mechanisms of autoantibody diversification to SLE-related autoantigens / U.S. Deshmukh, F. Gaskin, J.E. Lewis, C.C. Kannappell, S.M. Fu // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2003. – Vol. 987 – P. 91–98.
10. Gordon C. Update on systemic lupus erythematosus: autoantibodies and apoptosis / C. Gordon, M. Salmon // Clin. Med. – 2001. – № 1. – P. 10–14.
11. 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.
12. Mevorach D. Systemic lupus erythematosus and apoptosis: a question of balance // Clin. Rev. Allergy Immunol. – 2003. – Vol. 25, № 1. – P. 49–60.
13. 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. Werner, L. Björling, F. Ponten // Nat. Biotechnol. – 2010. – Vol. 28(12). – P. 1248–50.

14. White S., Apoptosis in systemic lupus erythematosus / S. White, A. Rosen // *Curr. Opin. Rheum.* – 2003. – Vol.15, № 5. – P. 557–562.

References

1. Zavodovskij B.V. Vlijanie terapii ksifonon na gisto-himicheskie pokazateli bol'nyh sistemnoj krasnoj volchankoj / B.V. Zavodovskij, I.A. Zborovskaja, E.G. Trofimova, L.E. Sivor-dova // *Nauchno-prakticheskaja revmatologija.* 2005. no. 3. pp. 44.
2. Il'in M.V. Kliniko-patogeneticheskoe znachenie opredelenija pokazatelej funkcionirovaniya aktivnosti i apoptoza ne-jtrofilov u bol'nyh sistemnoj krasnoj volchankoj / M.V. Il'in, P.A. Mal'ceva, E.V. Rechkina, N.I. Korshunov // *Prakticheskaja medicina.* 2011. no. 52. pp. 101–103.
3. Nasonov E.L. Klinicheskie rekomendacii. *Revmatologija* / pod red. E.L. Nasonova. M.: GJeOTAR Media, 2010. 288 p.
4. *Revmatologija: nacional'noe rukovodstvo* / pod red. E. L. Nasonova, V.A. Nasonovoj. M.: GJeOTAR-Media, 2008. 720 p.
5. Rebrova O.Ju. Statisticheskij analiz medicinskih dan-nyh. *Primenenie paketa prikladnyh programm STATISTICA.* M.: Mediasfera, 2006. 312 p.
6. Romanova N.V. Okislitel'nyj stress cirkulirujushhih fagocitov i porazhenija orga-nov i sistem pri sistemnoj krasnoj volchanke // *Fundamental'nye issledovanija.* 2005. no. 2. pp. 34.
7. Soroka N.F., Apoptoz limfocitov perefiricheskoy krovi u bol'nyh sistemnoj krasnoj volchankoj: patogeneticheskie i klin-icheskie aspekty / N.F. Soroka, A.I. Svirnov-skij, A.L. Rekun // *Nauchno-prakticheskaja revmatologija.* 2006. no. 4. pp. 44–52.
8. Ahsan H. Oxygen free radicals and systemic autoim-munity / H. Ahsan, A. Ali, R. Ali // *Clin. Exp. Immunol.* 2003. Vol. 131, no. 3. pp. 398–404.
9. Deshmukh U.S. Mechanisms of autoantibody diversifi-cation 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 pp. 91–98.

10. Gordon C., Update on systemic lupus erythematosus: autoantibodies and apoptosis / S. Gordon, M. Salmon // *Clin. Med.* 2001. no. 1. pp. 10–14.

11. McConnell J., Neutrophils from systemic lupus erythe-matosus patients demonstrate in-creased nuclear DNA damage / J. McConnell, A. Crockard, A. Cairns // *Clin. Exp. Rheumatol.* 2002. no. 20 (5). pp. 653–660.

12. Mevorach D. Systemic lupus erythematosus and apop-tosis: a question of balance // *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2003. Vol.25, no. 1. pp. 49–60.

13. Uhlen M., Towards a knowledge-based Human Pro-tein 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). pp. 1248–50.

14. White S., Apoptosis in systemic lupus erythematosus / S. White, A. Rosen // *Curr. Opin. Rheum.* 2003. Vol. 15, no. 5. pp. 557–562.

Рецензенты:

Краюшкин С.И., д.м.н., профессор, зав. кафедрой амбулаторной и скорой медицин-ской помощи, ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский универси-тет» Минздрава РФ, г. Волгоград;

Емельянов Д.Н., д.м.н., профессор, зав. кафедрой пропедевтики внутренних бо-лезней, ГБОУ ВПО «Волгоградский госу-дарственный медицинский университет» Минздрава РФ, г. Волгоград.

Работа поступила в редакцию 07.05.2013.