

УДК 616.5-004.1

**СИНДРОМ РЕЙНО: КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ
ОСОБЕННОСТИ ПРИ РАЗНЫХ ВАРИАНТАХ****Шилова Л.Н., Чернов А.С., Трубенко Ю.А., Красильников А.Н.,
Некрасова С.П., Левкина М.В.***ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства
здравоохранения Российской Федерации, Волгоград, e-mail: post@volgmed.ru*

Проведено исследование активности ферментов антиоксидантной системы (супероксиддисмутазы, глутатионредуктазы) и уровня антител к ферментам в сыворотке крови больных с первичным синдромом Рейно, системной склеродермией (ССД) и вибрационной болезнью. Выявлено снижение активности ферментов во всех группах больных, но наиболее выраженное у пациентов с ССД. В крови больных системной склеродермией нами обнаружены антитела к ферментам антиоксидантной системы, уровень специфических иммуноглобулинов возрастал по мере увеличения активности заболевания. Учитывая важную роль иммунологических сдвигов в развитии системного склероза, можно предположить, что одним из механизмов нарушения работы ферментных систем могут быть аутоантитела к ферментам. Всем больным проведена капилляроскопия сосудов ногтевого ложа. Наиболее выраженная редукция сосудов выявлена у больных ССД и вибрационной болезнью. Для пациентов с ПСР более характерна вазоспастическая реакция. Угнетение активности ферментов при вибрационной болезни обусловлено, видимо, высоким напряжением антиоксидантной системы на фоне выраженной гипоксии и продукции АФК. Таким образом, синдром Рейно, имеющий схожую клиническую картину, может определяться разными патогенетическими механизмами развития.

Ключевые слова: супероксиддисмутазы, глутатионредуктазы, антитела, системная склеродермия, вибрационная болезнь, первичный синдром Рейно

**RAYNAND'S SYNDROME: CLINICAL AND IMMUNOLOGIC PATTERNS
IN DIFFERENT WAYS****Shilova L.N., Chernov A.S., Trubenko Y.A., Krasilnikov A.N.,
Nekrasova S.P., Levkina M.V.***Volgograd state medical University, Volgograd, e-mail: post@volgmed.ru*

We had a research of activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, glutathione reductase) and the level of antibodies to enzymes in blood serum of patients with primary Raynaud's syndrome, systemic sclerosis (SSc) and vibration disease. There was a reduction of enzyme activity in all treatment groups, but it was most pronounced in patients with SSc. In the blood of patients with systemic sclerosis we found antibodies to the enzymes of the antioxidant system, the level of specific immunoglobulins increased with disease activity. Given the important role of immunological changes in the development of systemic sclerosis, we can assume that one of the mechanisms of disruption of enzyme systems may be autoantibodies to enzymes. All patients received capillaroscopy of the nail bed vessels. The most pronounced reduction of blood vessels was revealed in patients with SSc and vibration disease. Vasospastic reaction is more typical for patients with SEP. Inhibition of enzyme activity in vibration disease caused by apparently high voltage antioxidant system against the background of severe hypoxia and ROS production. Thus, Raynaud's syndrome, which has a similar clinical picture may be determined by different pathogenetic mechanisms of development.

Keywords: superoxide dismutase, glutathione reductase, antibodies, systemic scleroderma, vibration disease, primary Raynaud's syndrome

Синдром Рейно (СР) – это эпизодическое нарушение периферической циркуляции [2]. Различают первичный СР (или болезнь Рейно) и вторичный СР. Наиболее часто вторичный СР ассоциируется с системной склеродермией [2]. Кроме того, синдром Рейно может развиваться в результате воздействия профессиональных факторов, наиболее частыми являются вибрация, охлаждение и контакт с поливинилхлоридом [2]. Механизмы развития СР сложны и недостаточно изучены. Подчеркивается роль реперфузии и свободных кислородных радикалов в генезе ишемии при СР [3, 4, 7]. Антиоксидантная система организма пред-

ставлена целым рядом ферментов, призванных нивелировать патогенный эффект активных форм кислорода (АФК) [3]. Одним из важных звеньев системы антиоксидантной защиты являются супероксиддисмутазы (СОД – ЕС 1.15.1.1) и глутатионредуктазы (ГР – ЕС 1.6.4.2). Учитывая важную роль иммунологических сдвигов в развитии системного склероза [5, 6], можно предположить, что одним из механизмов нарушения работы ферментных систем могут быть аутоантитела к ферментам.

Цель исследования: выявление клинико-иммунологических особенностей при разных формах синдрома Рейно.

Материалы и методы исследования

Под наблюдением находилось 83 больных с достоверным диагнозом ССД, 30 – с первичным синдромом Рейно, 25 пациентов с локальной вибрационной болезнью, а также 30 практически здоровых лиц – доноров станции переливания крови, в возрасте от 25 до 47 лет, среди которых 17 женщин и 13 мужчин.

У 100% больных ССД диагностирован синдром Рейно. Антитела к СОД определяли в сыворотке крови больных по разработанному нами варианту непрямого иммуноферментного анализа [1], с использованием иммобилизованных антигенных форм энзима.

Больные ССД. В исследование были включены 83 больных, в том числе 81 (97,6%) – женщина и 2 (2,4%) мужчины. Средний возраст больных – $50,3 \pm 11,9$, продолжительность заболевания $8,3 \pm 7,1$ лет. У 56 (67,5%) больных определялась лимитированная форма болезни, у 27 (32,5%) – диффузная, а в 11 случаях отмечена перекрестная форма (overlap-синдром). У 49 (59%) больных диагностировано подострое течение процесса, у 28 (33,7%) – хроническое, а у 6 (7,2%) пациентов – острое. Согласно индексам активности болезни, разработанным Европейской группой по изучению ССД, I степень активности диагностирована у 23 (27,7%) человек, II – у 46 (55,4%), III – у 14 (16,9%). У всех больных определялся модифицированный кожный счет. Среднее значение кожного счета составило $12,37 \pm 7,18$.

Больные с синдромом Рейно. Под наблюдением находилось 30 больных с первичным синдромом Рейно: 18 (60%) – женщины, 12 (40%) – мужчины. Средний возраст больных – $31,6 \pm 13,4$, продолжительность болезни – $2,9 \pm 1,8$ лет. У всех больных отмечался 2-фазный характер изменения цвета (цианоз-гиперемия), не отмечалось выраженных болевых ощущений и не было трофических нарушений.

Больные с вибрационной болезнью. Под наблюдением находилось 25 больных с локальной вибрационной болезнью, из них мужчины – 100%. Средний возраст пациентов – $42 \pm 3,1$, продолжительность болезни – $3,5 \pm 1,2$ лет, длительность работы, связанной с вибрацией, составила в среднем $6,3 \pm 3,1$ лет. У 70% больных отмечалась выраженная форма синдрома Рейно (II, III, IV степени).

Антитела к СОД, ГР определяли в сыворотке крови больных по разработанному нами варианту непрямого иммуноферментного анализа [1], с использованием иммобилизованных антигенных форм энзимов и иммунопероксидазного конъюгата производства НИИ ЭМИ им. Гамалеи.

Иммобилизацию проводили методом эмульсионной полимеризации в потоке газообразного азота с включением магнитного материала в структуру полиакриламидного геля. В качестве антигена при определении антител к СОД использовали препарат супероксиддисмутазы из эритроцитов человека (Superoxide Dismutase from human erythrocytes, Cat. № S 9636), лиофилизированный порошок с активностью 3000 ед./мг, концентрация белка в нем составила 98 мг/мл (биуретовый метод). В ELISA-тесте использовался фермент в разведении 10 мкг/мл. При определении антител к ГР – препарат глутатионредуктазы (Glutathione Reductase from Baker's yeast, Cat. № G 3664), представляющий собой суспензию в 3,6 М растворе сульфата аммония (рН = 7,0) с активностью 240 ед./мг белка (биуретовый метод). В ELISA-тесте использовался фермент в разведении 20 мкг/мл. Ак-

тивность СОД определяли по методу С. Чевари и соавт. (1993), ГР по методу Hosoda и Nakamura, описанному М.А. Шифриным (1977). Изучение влияния антител к СОД на ее активность проводили в опытах *in vitro* с растворимой и иммобилизованной формами фермента. Источником специфических иммуноглобулинов служили сыворотки больных ССД с заранее высоким титром антител (экстинкция 0,2–0,6 е.о.п.). Всем пациентам проводилось тщательное клинико-лабораторное и инструментальное обследование. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программных пакетов «Statistica 6.0».

Результаты исследования и их обсуждение

Здоровые лица. При исследовании сывороток здоровых лиц уровень антител к СОД составил (0,057, 0,065), к ГР – (0,05, 0,057). Общая активность СОД в группе здоровых лиц составила $37,1 \pm 3,3$, ГР – $117,2 \pm 2,8$. Существенных различий уровня антител к энзимам в зависимости от пола, возраста не выявлено.

Больные с первичным синдромом Рейно. Повышенные значения антител выявлены: к СОД – у 5 (16,7%) человек, к ГР – у 2 (6,7%). Полученные значения имеют статистически значимые отличия от группы здоровых: U-test = 35,0, $p = 0,0000$; 24, $p = 0,0000$ – соответственно (табл. 1).

Значения активности изучаемых ферментов были следующие: СОД – $32,9 \pm 6,2$; ГР – $107,9 \pm 11,4$. Статистически значимых связей между изучаемыми показателями и возрастом, длительностью болезни не обнаружено. Активность фермента имела большую тенденцию к снижению по сравнению со здоровыми лицами, что, вероятно, связано с большим напряжением антиоксидантной системы при наличии синдрома Рейно, приводящего к гипоксии тканей. Выраженность уменьшения активности энзимов достоверно меньше, чем в группе больных ССД ($p < 0,005$).

Больные вибрационной болезнью. При исследовании сывороток больных антитела к изучаемым энзимам обнаружены у 2 пациентов (8%) к СОД и у 1 больного к ГР, что, вероятно, связано с выраженной прогрессией их заболевания (III стадия). Активность ферментов в группе больных достоверно ниже по сравнению с здоровыми ($p < 0,005$) и имела тенденцию к большему снижению по сравнению с больными с первичным синдромом Рейно ($p > 0,02$) (акт СОД – $28,2 \pm 1,1$, ГР – $103 \pm 2,5$).

Таблица 1

Показатели активности СОД и содержание антител к ферментам в сыворотке крови здоровых лиц, больных ССД, вибрационной болезнью, с первичным СР

Контингент	N	Статист. показатели	АТ к СОД	АТ к ГР
Здоровые	30	М m ДИ	0,061 0,002 0,057...0,065	0,054 0,001 0,05...0,057
Больные ССД (группа в целом)	83	М m ДИ	0,18* ^{o'} 0,001 0,16...0,2	0,14* ^{o'} 0,006 0,13...0,15
Больные с первичным СР	30	М m ДИ	0,1* 0,001 0,08...0,13	0,07* 0,003 0,067...0,08
Больные с вибрационной болезнью	25	М m ДИ	0,074 0,002 0,062...0,083	0,06 0,002 0,058...0,062

Примечания: М – среднее значение, m – ошибка репрезентативности, ДИ – доверительный интервал; * достоверные отличия с донорами; ^{o'} достоверные отличия с больными ПСР; ' – достоверные отличия с больными вибрационной болезнью.

Больные ССД. Повышенные значения антител к изучаемым ферментам выявлены: к СОД у 57 (68,7%) пациентов, к ГР – у 55 (66,3%). Показатели активностей изучаемых ферментов составили: СОД – $23,9 \pm 5,9$; ГР – $77,6 \pm 16,1$, причем отмечалась тенденция к более выраженному снижению активности по мере нарастания активности процесса. В ходе работы нами выявлены статистически значимые корреляционные связи между уровнем всех изучаемых антител и активностью патологического процесса: Ат к СОД – Spearman $R = 0,57$, $p = 0,0000$, Ат к ГР – Spearman $R = 0,6$, $p = 0,0000$. Данные, полученные для всей группы больных ССД, имеют статистически значимые отличия от уровня у здоровых лиц, больных ПСР и вибрационной болезнью (табл. 1).

При анализе полученных данных в группе больных с I степенью активности повышенные уровни антител к СОД обнаружены у 6 (26,1%) пациентов, к ГР – у 5 (21,7%), при сравнении с больными ПСР – только уровень активности ГР статистически значимо отличался от группы больных – M-W-U test = 111, $p = 0,04$. Активность II: выявлены повышенные уровни антител к СОД у 37 человек (80,4%), ГР – у 37 (80,4%). III степень активности: повышенные уровни антител выявлены: к СОД у всех больных (100%), к ГР – у 13 человек (92,9%). Все полученные данные имеют статистически значимые отличия от уровня у здоровых лиц, больных ПСР и вибрационной болезнью.

Кроме того, нами выявлено, что все больные ССД с высоким содержанием антител к изучаемым ферментам имели высокую

степень синдрома Рейно (II–IV). Известно, что СР приводит к ишемии и, следовательно, гипоксии тканей [3]. В результате этих процессов происходит усиление перекисидации мембранных структур, апоптоза клеток, что при снижении антиоксидантной защиты, в том числе, вероятно, вследствие образования антител к ферментам, наблюдающейся при системных заболеваниях соединительной ткани, способствует развитию различной висцеральной патологии [3, 4]. Всем больным проводилась капилляроскопия сосудов ногтевого ложа. Количество капилляров в группе больных ПСР составило $10,35 \pm 2,83$, что имеет статистически значимые отличия от здоровых лиц (M-W U-test = 140, $p = 0,005$), количество аваскулярных зон, наличие кустовидных деформаций сосудов, появление экстравазатов – не имеют статистически значимых отличий от здоровых. Среднее количество расширенных капилляров составило $1,24 \pm 1,6$, данный показатель статистически значимо отличается от здоровых лиц – M-W U-test = 154,5, $p = 0,01$. Статистически значимых корреляционных связей полученных результатов с возрастом, длительностью заболевания не было отмечено. Таким образом, при капилляроскопии сосудов ногтевого ложа при ПСР преобладали явления умеренного вазоспазма без деформации сосудов и аваскулярных зон.

В группе больных вибрационной болезнью количество капилляров составило $8,3 \pm 2,8$, количество аваскулярных зон – $1,2 \pm 0,7$, что имеет статистически значимые отличия от здоровых лиц и больных ПСР ($p = 0,003$, $p = 0,005$ соответственно). Статистически значимых корреляционных

связей полученных результатов с возрастом не отмечено, но они определяются в зависимости от продолжительности болезни.

Количество капилляров в группе больных ССД составило в среднем $6,5 \pm 1,8$, аваскулярных зон – $1,94 \pm 0,9$, кустовидных капилляров – $1,7 \pm 1,5$, экстравазаты – $0,06 \pm 0,24$, расширенные капилляры – $2,4 \pm 1,8$. Все показатели больных ССД статистически значимо отличались от показателей здоровых и больных ПСР и вибрационной болезнью.

Из общепринятых иммунологических показателей обращает на себя внимание определение АНФ, Scl-70 и антицентромерных антител (АЦА). В группе больных с ПСР и вибрационной болезнью выявлено определение положительного АНФ у 5 (16,7%) и 2 (8%) человек соответственно, Scl-70 и АЦА – не определялись. У больных ССД АНФ обнаружен у 70 (84,3%) пациентов, Scl-70 у 34 (40,1%), а АЦА у 43 (51,8%) человек. Таким образом, при ПСР и вибрационной болезни отмечаются менее выраженные иммунологические изменения.

В опытах *in vitro*, проведенных для определения патогенетической роли антител к изучаемому ферменту, нами были выявлены следующие закономерности, представленные в табл. 2.

конформационными изменениями структуры молекулы, приводящими к неполному совпадению активного центра фермента и его антигенной детерминанты. Таким образом, можно предположить, что выявляемые нами антитела к ферменту антиоксидантной системы являются одной из вероятных причин снижения их энзиматической активности у больных с системным склерозом.

Итак, в крови больных с системной склеродермией выявляются антитела к СОД, ГР, продукция которых увеличивается с возрастанием активности процесса, наличием более тяжелых форм течения заболевания и сопровождается снижением активности фермента. Следовательно, одной из причин угнетения антиоксидантной активности, вероятно, могут явиться аутоантитела к энзиму. В крови больных с первичным синдромом Рейно выявлены достоверно менее выраженные изменения антиоксидантной системы и несущественная продукция антител к энзимам. Обнаружение антител к ферментам в крови больных с первичным СР может, вероятно, служить прогностически неблагоприятным фактором возможного начала системного заболевания соединительной ткани, поэтому эти больные требуют тщательного наблюдения в динамике. Кроме

Таблица 2

Сравнительная характеристика активности иммобилизированной и растворимой форм фермента после взаимодействия с антителами

Фермент	Форма фермента (исходная активность)	Активность фермента после взаимодействия		
		с антителами (n = 30)	с сывороткой доноров	контроль (физ. раствор)
СОД (ед./мг)	Иммобилизированная (34,3 ед./мг)	$10,2 \pm 0,06^*$	$33,4 \pm 0,14$	$37,3 \pm 0,05$
	Растворимая (32,2 ед./мг)	$19,3 \pm 0,07^*$	$32,3 \pm 0,1$	$37,5 \pm 0,07$

Пр и м е ч а н и е . * – достоверные отличия с контролем и донорами.

При проведении исследования активности иммобилизированной формы фермента после взаимодействия с антителами *in vitro*, нами выявлено снижение активности энзима на 60–70% по сравнению с исходной, кроме того, получены статистически достоверные различия с контролем (физиологический раствор) и донорами ($p < 0,05$) (табл. 2). Эти изменения связаны, вероятно, с блокированием активного центра фермента, являющегося одновременно и антигенной детерминантой. При исследовании взаимодействия растворимой формы энзима нами обнаружено снижение активности фермента на 30–40%, вероятно, это можно объяснить

того, особого внимания заслуживают пациенты с выраженными капилляроскопическими изменениями.

В группе больных с СР на фоне вибрационной болезни отмечается выраженное угнетение активности ферментов и незначительная продукция антител к СОД, ГР по сравнению с больными ССД. Это, вероятно, связано с другими механизмами развития синдрома Рейно, меньшим участием аутоантителогенеза. Угнетение активности ферментов обусловлено, видимо, высоким напряжением антиоксидантной системы на фоне выраженной гипоксии и продукции АФК. Таким образом,

синдром Рейно, имеющий схожую клиническую картину, может определяться разными патогенетическими механизмами развития.

Список литературы

1. Гонтарь И.П. Эмульсионная полимеризация как метод, модифицирующий ферменты с сохранением биологических свойств их наноструктур / Гонтарь И.П., Сычева Г.Ф., Александров А.В., Шилова Л.Н., Симакова Е., Емельянов Н.Н., Матасова Н.Н., Маслакова Л.А., Зборовский А.Б. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – Т. 150 – № 12. – С. 715–719.
2. Гусева Н.Г. Системная склеродермия и склеродермическая группа болезней // РМЖ. – 2000. – Т.8. – № 9. – С. 383–388.
3. Зборовская И.А. Ревматические болезни и антиоксидантная система. – М.: Медицина, 2005. – 127 с.
4. Мазуров В.И. Диффузные болезни соединительной ткани: руководство для врачей / под ред. проф. В.И. Мазурова. – СПб.: СпецЛит, 2009. – 192 с.
5. Шилова Л.Н. Клинико-патогенетическое значение наличия антител к ферментам антиоксидантной системы при синдроме Рейно / Шилова Л.Н., Гонтарь И.П., Зборовская И.А., Новикова О.В., Емельянов Н.Н. // Клиническая медицина. – 2010. – № 2. – С. 43–46.
6. Alkassab F. Overlap of systemic sclerosis and rheumatoid arthritis // J-Rheumatol. – 2007. – Jul; 34(7). – P. 1593–1594.
7. Di-Franco M. Autonomic dysfunction and microvascular damage in systemic sclerosis. // Di-Franco M., Paradiso M., Riccieri V., Basili S., Mammarella A., Valesini G. // Clin-Rheumatol. – 2007. – Aug; 26(8). – P. 1278–1283.

References

1. Gontar I.P. Jemulsionnaja polimerizacija kak metod, modifirujushhij fermenty s sohraneniem biologicheskij svojstv ih nanostruktur. Gontar I.P., Sycheva G.F., Aleksandrov A.V., Shilova L.N., Simakova E., Emeljanov N.N., Matasova N.N., Maslakova L.A., Zborovskij A. Bjulleten jeksperimentalnoj biologii i mediciny. 2010, T. 150, no. 12, pp. 715–719.
2. Guseva N.G. Sistemnaja sklerodermija i sklerodermicheskaja grupa boleznej. Guseva N.G., RMZh, 2000, T.8, no. 9, pp. 383–388.
3. Zborovskaja I.A. Revmaticheskie bolezni i antioksidantnaja sistema. Zborovskaja I.A. M: Medicina, 2005, 127 p.
4. Mazurov V.I. Diffuznye bolezni soedinitelnoj tkani: rukovodstvo dlja vrachej., pod red. prof. V.I.Mazurova, Spbju: SpecLit, 2009, 192 p.
5. Shilova L.N. Kliniko-patogeneticheskoe znachenie nalichija antitel k fermentam antioksidantnoj sistemy pri sindrome Rejno. Shilova L.N., Gontar I.P., Zborovskaja I.A., Novikova O.V., Emeljanov N.N. Klinicheskaja medicina. 2010. no. 2. pp. 43–46.
6. Alkassab F. Overlap of systemic sclerosis and rheumatoid arthritis. Alkassab F., J-Rheumatol., 2007, Jul; 34(7), pp. 1593–1594.
7. Di-Franco M. Autonomic dysfunction and microvascular damage in systemic sclerosis. Di-Franco M., Paradiso M., Riccieri V., Basili S., Mammarella A., Valesini G. Clin-Rheumatol., 2007, Aug; 26(8), pp. 1278–1283.

Рецензенты:

Гонтарь И.П., д.м.н., профессор, зав. клинико-иммунологической лабораторией, ФГБНУ НИИ КиЭР, г. Волгоград;
Зборовская И.А., д.м.н., профессор, директор, ФГБНУ НИИ КиЭР, г. Волгоград.