

АБЗИМНАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ПРИ СПОНДИЛОАРТРОПАТИЯХ

Кундер Е.В.

УО «Витебский государственный медицинский университет», кафедра госпитальной терапии, г. Витебск, Беларусь

Резюме. Использовались поликлональные иммуноглобулины класса G подклассов 1, 2, 4, выделенные из сыворотки 255 пациентов и 69 здоровых лиц комбинированным риванол-аффиннохроматографическим методом. Постановка реакций осуществлялась согласно методикам, разработанным и апробированным нами ранее при оценке абзимной активности у больных с различной патологией. Уровни ДНКазной (деоксирибонуклеазной), протеолитической БАПНА-амидазной (бензоиларгинин-паранитроанилид-амидазной) и супероксиддисмутазной абзимной активности при спондилоартропатиях оказались достоверно ($p < 0,001$) выше по сравнению с контрольной группой. Каталазная активность иммуноглобулинов при изучаемых заболеваниях была сопоставима с контрольным уровнем ($p > 0,05$). Анализ взаимоотношений между абзимной активностью и клинико-лабораторными признаками заболеваний обнаружил ряд достоверных взаимосвязей. Установлено преобладание абзимной ДНКазной активности у пациентов с псориатическим артритом по сравнению с реактивным артритом и анкилозирующим спондилитом ($p < 0,001$).

Ключевые слова: спондилоартропатии, абзимная активность.

Kunder E.V.

ABZYME ACTIVITY OF POLYCLONAL IMMUNOGLOBULINS IN SPONDYLOARTHROPATHIES

Abstract. Polyclonal immunoglobulins G (subclasses 1, 2, 4) from sera of 255 patients and 69 healthy persons were studied by a combined approach using rivanol treatment and affinity chromatography. Enzymatic reactions were carried out according to the methods that we have previously developed and validated for evaluation of abzyme activity in the patients with different disorders. The levels of DNase, proteolytic BAPNA-amidase (benzoylarginine-p-nitroanilide amidase), and superoxyde dismutase abzyme activity in spondyloarthropathies proved to be significantly higher ($p = 0.001$), as compared with a control group. Catalase activity of immunoglobulines in the disorders studied was compatible to control levels ($p > 0.05$). Analysis of relations between abzyme activity and clinical and laboratory signs of the diseases has revealed some significant correlations. Prevalence of abzyme DNase activity is found in the patients with psoriatic arthritis, as compared to reactive arthritis and ankylosing spondylitis ($p < 0.001$). (*Med. Immunol.*, vol. 11, N 2-3, pp 215-220)

Введение

Спондилоартропатии объединяют заболевания, характеризующиеся прогрессирующим хроническим воспалительным процессом с поражением осевого скелета и периферических суставов и имеющих некоторые общие этиопатогенетические и клинические признаки. Типичными

представителями этой патологии являются псориатический артрит (ПА), реактивные артриты (РеА) и анкилозирующий спондилит (АС). На роль перспективного направления изучения спондилоартропатий может претендовать абзимология, развитие которой открывает значительные возможности для исследования различных иммунологических изменений [3]. К настоящему времени доказано существование абзимов – антител и иммуноглобулинов (Ig), катализирующих большинство значимых биоорганических реакций. Абзимная активность изучается при системных заболеваниях соединительной ткани, ревматоидном

Адрес для переписки:

Кундер Елена Владимировна,
210038, Беларусь, г. Витебск, пр. Победы, д. 2, кв. 48.
Тел.: (375) 296-778-220.
E-mail: elsid7@mail.ru

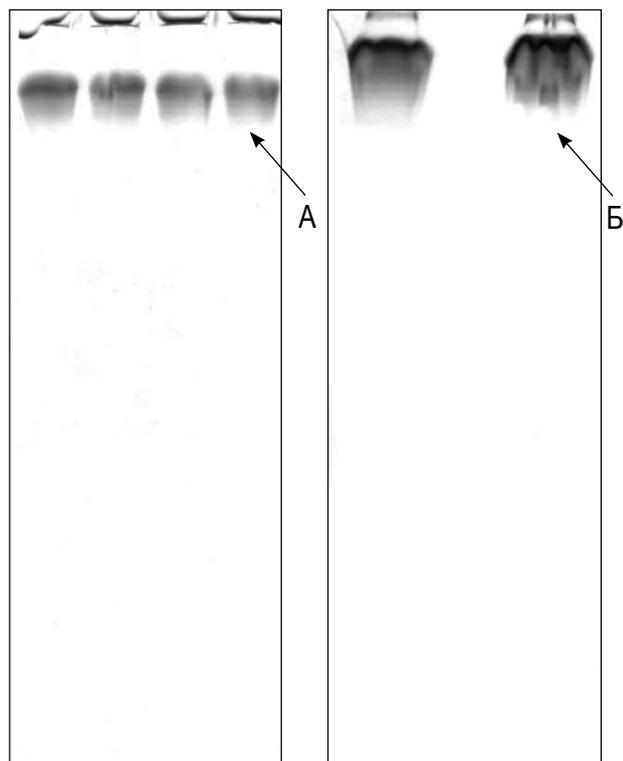


Рисунок 1. Электрофорез выделенных препаратов IgG в 12% ПАГ в присутствии SDS-Na, окраска Coomassie R250

артрите, при заболеваниях щитовидной железы, инфекционной патологии [5,7,8,12]. Предварительные результаты в этом направлении дают основания для дальнейших исследований, в том числе и с целью разработки новых методов диагностики спондилоартропатий.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 255 пациентов (98 – с псориатическим артритом, 51 – с анкилозирующим спондилитом и 106 – с реактивным хламидиоиндуцированным артритом). Контрольную группу составили 69 здоровых лиц. Принадлежность заболеваний к спондилоартропатиям устанавливалась в соответствии с классификационными критериями Amor B. et al. [9]. Средний возраст пациентов равнялся $40,1 \pm 0,8$ года, мужчин было 153 (60%), женщин – 102 (40%).

Диагноз ПА выставлялся согласно критериям Mathies [11] и критериям Института ревматологии РАМН (1989) [1]. Активность воспаления 1 степени определена в 42 случаях (43%), 2 степени – в 41 (42%), 3 степени – в 15 (15%). Рентгенологическая 1 стадия артрита не была выявлена, 2 стадия – у 63 (64%), 3 стадия – у 24 (23%), 4 стадия – у 12 пациентов (13%).

В группе больных РеА для диагностики урогенитальной инфекции использовались методы микроскопии, бактериологические методы, РИФ

и ПЦР, а также культуральный метод. У 85 больных (80%) констатировано наличие хламидийной инфекции, у 17 больных (13%) – сочетание хламидийной инфекции и трихомоноза, у 4 (3%) – сочетание хламидийной, уреоплазменной инфекции и трихомоноза.

Диагноз АС выставлялся в соответствии с модифицированными Нью-Йоркскими критериями [14]. Центральная форма заболевания была выявлена у 41 пациентов (80%), ризомелическая – у 8 (16%), периферическая – у 2 (4%). Активность заболевания 1 степени была выявлена у 12 больных (24%), 2 – у 24 (47%), 3 – у 15 пациентов (29%). Рентгенологическая 1 стадия выявлена не была, 2-я определялась у 12 пациентов (24%), 3-я – у 19 (36%), 4-я – у 20 больных (40%).

Контрольная группа состояла из 69 здоровых доноров Витебской областной станции переливания крови, мужчин было 44 (64%), женщин – 25 (36%). Средний возраст в контрольной группе составил $36,1 \pm 1,1$ года.

Выделение препаратов поликлональных Ig класса, G 1, 2 и 4 подклассов из сыворотки крови проводили комбинированным риванол-аффиннохроматографическим методом [3]. Контроль чистоты полученных Ig проводили с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в системе буферов по Laemmli с использованием 10% или 12% разделяющего геля в присутствии додецилсульфата натрия по методам, изложенным в [3]. Исходно гель окрашивали Кумасси R250. По результатам электрофореза обнаруживалась одна белковая полоса, мигрирующая в зоне гамма-глобулинов (рис. 1А). Увеличение белковой нагрузки на трек (рис. 1Б), а также окрашивание гелей нитратом серебра дополнительных полос не выявило, что свидетельствовало о гомогенности полученных IgG.

Дополнительные доказательства принадлежности каталитической активности антителам были получены под руководством профессора Г.А. Невинского в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН с использованием предоставленных нами препаратов антител [12]. Изучалась ДНКазная активность антител *in situ* методом диссоциирующего электрофореза, а также путем FPLC хроматографии антител в диссоциирующих условиях. Полученные результаты подтвердили принадлежность каталитической активности антителам.

Нами исследованы следующие виды абзимной активности: деполимеризующая (ДНКазная и протеолитическая БАПНА (бензоиларгинин-паранитроанилид-амидазная) и оксидоредуктазная (каталазная и супероксиддисмутазная (СОД)). Постановка реакций каталитической

активности Ig осуществлялась согласно методикам, разработанным нами и апробированным на различных биологических моделях [4, 5]. Проводился визуальный учет реакции ДНКазной активности, при этом сгусткообразование оценивали в баллах. Отсутствие активности – компактный сгусток – 0 баллов; 1 балл – минимальная активность – рыхлый сгусток; 2 балла – слабая активность – рыхлый сгусток, хлопья, нити; 3 – умеренная активность – хлопья, нити; 4 – высокая активность – распад сгустка, хлопья, нити; 5 баллов – максимальная активность – полный распад сгустка ДНК с образованием гомогенной взвеси.

Уровни каталазной и СОД активности выражали в условных единицах (УЕ), БАПНА-амидазной – в единицах оптической плотности (ЕОП). Для каталазной и СОД реакций формула расчета активности имела следующий вид:

$$A = \frac{(E_k - E_o)}{E_k * 100\%},$$

где А – активность препарата, Ек – средняя оптическая плотность контрольных проб, Ео – средняя оптическая плотность опытных проб.

Для БАПНА-амидазной реакции формула расчета активности имела следующий вид:

$$A = E_o - E_k,$$

где А – активность препарата, Ек – средняя оптическая плотность контрольных проб, Ео – средняя оптическая плотность опытных проб.

Достоверность различий определяли с помощью параметрических (Стьюдента) в случае нормального распределения и непараметрических (Манна–Уитни) критериев статистики. Для оценки диагностической точности разработанных лабораторных тестов проводился расчет операционных характеристик [6].

Результаты

Уровень ДНКазной активности Ig при спондилоартропатиях достоверно ($p < 0,001$) отличался от величины данной активности у здоровых лиц ($2,8 \pm 0,08$ по сравнению с $0,43 \pm 0,08$). ДНКазная активность Ig при ПА достоверно ($p < 0,001$) отличалась от контрольного уровня ($3,7 \pm 0,08$ по сравнению с $0,43 \pm 0,08$). ДНКазная активность у больных РеА достоверно ($p < 0,001$) отличалась от контрольной ($2,5 \pm 0,1$ по сравнению с $0,43 \pm 0,08$). ДНКазная активность при АС достоверно ($p < 0,001$) отличалась от контрольного значения ($1,5 \pm 0,14$ по сравнению с $0,43 \pm 0,08$). Уровень ДНКазной активности Ig при ПА достоверно ($p < 0,001$) преобладал над данным видом активности у всех обследованных лиц со спондилоартропатиями ($p < 0,001$).

БАПНА-амидазная активность Ig у больных спондилоартропатиями достоверно ($p < 0,05$) отличалась от контрольных значений ($0,042 \pm 0,009$ по сравнению с $0,01 \pm 0,001$). БАПНА-амидазная активность при ПА достоверно ($p < 0,05$) превышала контрольную ($0,051 \pm 0,017$ по сравнению с $0,01 \pm 0,001$). БАПНА-амидазная активность при РеА также достоверно ($p < 0,05$) превышала таковую у здоровых лиц ($0,061 \pm 0,023$ по сравнению с $0,01 \pm 0,001$). БАПНА-амидазная активность при АС достоверно отличалась ($p < 0,05$) от контрольной ($0,02 \pm 0,024$ по сравнению с $0,01 \pm 0,001$).

Уровень каталазной активности Ig при спондилоартропатиях достоверно ($p > 0,05$) не отличался от величины данного вида активности у здоровых лиц ($4,7 \pm 0,46$ по сравнению с $4,3 \pm 0,625$). Каталазная активность ИГ у больных ПА достоверно не превышала ($p > 0,05$) контрольные значения ($4,18 \pm 0,48$ по сравнению с $4,3 \pm 0,625$). Каталазная активность Ig при РеА также достоверно превышала ($p < 0,05$) таковую у здоровых лиц ($5,98 \pm 0,85$ по сравнению с $4,3 \pm 0,625$). Каталазная активность Ig у пациентов с АС имела значения, не отличающиеся достоверно ($p > 0,05$) от контрольных значений ($4,9 \pm 0,68$ по сравнению с $4,3 \pm 0,625$).

СОД активность у всех больных достоверно ($p < 0,001$) превышала контрольные значения ($23,6 \pm 0,84$ по сравнению с $4,1 \pm 0,67$). При ПА данная активность достоверно ($p < 0,001$) отличалась от контрольной ($24,7 \pm 1,1$ по сравнению с $4,1 \pm 0,67$). СОД активность Ig у больных РеА также достоверно ($p < 0,001$) отличалась от величины активности среди доноров ($21,7 \pm 1,2$ по сравнению с $4,1 \pm 0,67$). Уровень СОД активности при достоверно ($p < 0,001$) отличался от донорского значения ($16,4 \pm 1,23$ по сравнению с $4,1 \pm 0,67$).

При проведении корреляционного анализа между величинами каталитической активности Ig и клиническими данными, а также лабораторными изменениями получены результаты, представленные в таблице 1.

В результате расчета операционных характеристик разработанного метода дифференциальной диагностики спондилоартропатий для различных величин ДНКазной активности Ig, выраженной в баллах, было установлено, что оптимальные уровни данных операционных характеристик соответствуют ДНКазной активности, равной 4 баллам. Результаты расчета операционных характеристик определения ДНКазной активности Ig представлены в таблице 2.

Согласно рекомендациям Американской коллегии ревматологов [13] наиболее полезными для диагностики ревматических заболеваний являются лабораторные тесты с ОП+ > 5 и ОП- < 0,2; полезными – с ОП+ > 2 и ≤ 5, ОП- > 0,2 и ≤ 0,5;

ТАБЛИЦА 1. РЕЗУЛЬТАТЫ КОРРЕЛЯЦИОННОГО АНАЛИЗА ПОКАЗАТЕЛЕЙ АБЗИМНОЙ АКТИВНОСТИ И КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫХ ПРИЗНАКОВ СПОНДИЛОАРТРОПАТИЙ

Коррелирующие признаки	Показатели корреляции		
	Кoeffициент корреляции, r	Уровень значимости, p	Число наблюдений, n
Спондилоартропатии			
ДНКазная активность ИГ и наличие артрита	0,5	< 0,001	255
ДНКазная активность и поражение кожи	0,57	< 0,001	245
Псориатический артрит			
ДНКазная активность ИГ и экссудативный псориаз	0,6	< 0,001	98
ДНКазная активность ИГ и непрерывно рецидивирующее течение псориаза	0,74	< 0,001	57
ДНКазная активность ИГ и длительность ониходистрофии	0,36	0,0056	57
ДНКазная активность и стадия артрита	-0,3	0,026	57
ДНКазная активность ИГ и наличие сакроилеита	0,42	< 0,001	98
СОД активность ИГ и наличие экссудативного псориаза	0,58	0,0012	28
Реактивные артриты			
ДНКазная активность ИГ и уровень СОЭ	0,33	< 0,001	< 0,001
ДНКазная активность ИГ и число лейкоцитов в крови	0,37	< 0,001	< 0,001
ДНКазная активность ИГ и число эритроцитов в крови	-0,25	0,0275	106
ДНКазная активность ИГ и количество Т-лимфоцитов	0,31	0,04	42
Анкилозирующий спондилит			
ДНКазная активность ИГ и стадия сакроилеита	0,3	0,035	51
ДНКазная активность ИГ и лечение сульфасалазином	-0,36	0,05	29
БАПНА-амидазная активность ИГ и стадия сакроилеита	-0,61	0,0059	19
БАПНА-амидазная активность и стадия спондилита	-0,58	0,0044	22
БАПНА-амидазная активность и BASDAI	-0,63	0,0018	22

ТАБЛИЦА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТА ОПЕРАЦИОННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДНКАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ У ОБСЛЕДОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ

Характеристики теста	ПА и АС	ПА и РеА	ПА и (АС+РеА)
Диагностическая чувствительность	73%	73%	73%
Диагностическая специфичность	90%	80%	84%
Предсказательная ценность положительного результата	93%	77%	73%
Предсказательная ценность отрицательного результата	63%	76%	83%
Диагностическая эффективность	78,5%	76,5%	79%
Отношение правдоподобия положительного результата (ОП+)	7,4	3,7	4,4
Отношение правдоподобия отрицательного результата (ОП-)	0,3	0,34	0,33

не имеющими пользы – с ОП+ ≤ 2 и ОП- $> 0,5$. Таким образом, использование определения ДНКазной активности Ig соответствует критериям полезных диагностических тестов.

Обсуждение

Таким образом, в крови пациентов со спондилоартропатиями циркулируют антитела, обладающие собственной деполимеризующей и оксидоредуктазной активностью. Наибольшие уровни ДНКазной активности отмечены при ПА, что доказывает более выраженную аутоиммунную агрессию при данном заболевании по сравнению с другими заболеваниями из группы спондилоартропатий. Принимая во внимание выявление при псориазе антинуклеарных антител, антител к двухспиральной ДНК, к РНП, антиперинуклеарных антител [10], нельзя исключить, что абзимы с ДНКазной активностью на ранних этапах заболевания имеют приспособительное значение, разрушая избыток нуклеиновых кислот, появляющихся в процессе цитолиза. В дальнейшем обладающие ДНКазной активностью антитела могут оказывать повреждающее воздействие на ткани, реализуя цитотоксические эффекты. Абзимы регулируют клеточное развитие, участвуют в процессах апоптоза, а при псориазе нарушения апоптотического процесса являются одной из причин гиперпролиферации эпидермиса [2]. ДНКазная активность антител находится в прямой корреляционной зависимости с различными клиническими (наличие артрита, пролиферативные явления в суставах, поражение кожи, длительность ониходистрофии, наличие сакроилеита и др.) и лабораторными показателями (количеством лейкоцитов, эритроцитов, Т-лимфоцитов), что доказывает ее участие в патогенетических процессах при хроническом аутоиммунном воспалении. Отрицательная корреляция ДНКазной активности Ig с рентгенологической стадией заболеваний, вероятно, свидетельствует о том, что наибольшие уровни абзимной активности характерны для ранних стадий заболеваний, а по мере формирования структурных изменений костно-суставной системы происходит снижение величин этой активности и степени аутоиммунной агрессии. Корреляция ДНКазной активности с непрерывно рецидивирующим течением псориаза может иметь диагностическое значение. У пациентов с данным вариантом течения кожного псориаза наличие высоких уровней ДНКазной активности может служить маркером скорой реализации суставного синдрома и должно стать поводом для обследования больного на наличие бессимптомной артропатии. Отрицательная корреляция между ДНКазной активностью Ig и приемом сульфасалазина подтверждает необходимость назначения базисной терапии.

Каталазная активность Ig при спондилоартропатиях сопоставима с контрольными значениями. БАПНА-амидазная активность Ig при спондилоартропатиях достоверно превышает контрольные величины, однако демонстрирует однообразные и достаточно низкие уровни, что снижает ее диагностическую ценность при данных заболеваниях. БАПНА-амидазная активность при АС отрицательно коррелирует со стадией спондилита, сакроилеита, индексом BASDAI. По нашим данным, этот вид активности также имеет максимальные значения у пациентов с ранними формами АС, что объясняет выявленные корреляционные отношения.

СОД-активность Ig при спондилоартропатиях превышает контрольные величины. Антитела, обладающие СОД-активностью, могут являться акцептором свободных кислородных радикалов, осуществляя торможение перекисного окисления липидов и белков. Эти абзимы способны защитить клетку от свободно радикального повреждения. Вероятно, при псориазе СОД-активность имеет протективное значение, разрушая избыточное количество супероксида, основными источниками которого являются лейкоциты в процессе фагоцитоза, цепи переноса электронов (митохондрии), некоторые флавинодержащие оксидоредуктазы, а также процессы аутоокисления белков и метаболитов.

Проведенная оценка ДНКазной активности Ig у больных демонстрирует достоверное преобладание этого параметра у больных ПА по сравнению с другими заболеваниями из данной группы. Если за диагностический уровень псориазического артрита принять ДНКазную активность иммуноглобулинов, равную 4 баллам и более, то чувствительность метода составляет 73%, а специфичность равна 84%. Отношение правдоподобия положительного результата теста (ОП+) равняется 4,4, отношение правдоподобия отрицательного результата теста (ОП-) равно 0,33. Определение ДНКазной активности Ig может использоваться в качестве дополнительного диагностического критерия псориазического артрита.

Исследования проведены по теме ГНТП 01.12 «Лечебные и диагностические технологии», подпрограмма «Терапия» (2006-2008 г.г.), а также при поддержке БРФФИ (№ Б03-345), РФФИ-БФФИ (04-04-81017).

Список литературы

1. Агабабова Э.Р., Бадочкин В.В., Эрдес Ш. Разработка и апробация диагностических критериев псориазического артрита // Терапевтический архив. – 1989. – № 12. – С. 117-121.

2. Антилевский В.В., Мяделец О.Д., Саларев В.В. Морфофункциональная характеристика кожи больных псориазом. Актуальная дерматология. – М.: Медицинская книга, 2000. – С. 133-153.
3. Генералов И.И. Абзимная активность иммуноглобулинов. – Витебск. – 2000. – 167 с.
4. Генералов И.И., Борисевич Т.Н., Кундер Е.В. Методические подходы к определению окислительно-восстановительной активности антител // Вестник ВГМУ. – 2005. – № 3. – С. 16-21.
5. Генералов И.И., Сидорская Е.В. Абзимная активность препаратов IgG у больных ревматоидным артритом и системной красной волчанкой // Иммунология. – 1998. – № 3. – С. 54-56.
6. Насонов Е.Л., Александрова Е.Н. Современные стандарты лабораторной диагностики ревматических заболеваний. – М., 2006. – 70 с.
7. Хитров А.Н., Мальцев К.А., Введенская О.Ю. Каталитические аутоантитела как новый молекулярный инструмент в ревматологической практике // Терапевтический архив. – 2006. – № 6. – С. 59-62.
8. Хитров А.Н., Ромаданова Н.Б., Огнева Е.А. Хитров А.Н., Ромаданова Н.Б., Огнева Е.А., Наумова Т.Е., Алекберова З.С., Воробьев И.И., Габибов А.Г., Панаморенко Н.А., Сучков С.В. ДНК-абзимы при ревматоидном артрите: патогенетическая и клиническая значимость // Терапевтический архив. – 2005. – № 11. – С. 75-80.
9. Amor B., Dougados M., Litrar V. Les criteries de spondyloarthropathies de classification et/ou daide au diagnostic? // Rev. Rheumatol. – 1995. – Vol.62. – P. 11-16.
10. Calzavara-Pinton P.G., Franceschini F., Manera C. Incidence of antiperinuclear factor in patients with psoriatic arthritis // Adv. Exp. Med. Biol. – 1999. – Vol. 455. – P. 215-220.
11. Mathies H. Psoriatic arthritis // Acta Med. Austriaca. – 1974. – Vol. 11. – P. 3-12.
12. Parkhomenko T.A., Odintsova E.S., Buneva V.N., Kunder E.V., Zhyltsov I.V., Senkovich S.A., Generalov I.I., Nevinsky G.A. DNA-hydrolyzing activity of IgG antibodies from the sera of patients with diseases caused by different bacterial infections // J. Cell. Mol. Med. – 2008. – Vol.12, N5. – P. 1-13.
13. Shojania, K. What laboratory tests are needed? // CMAJ. – 2000. – Vol. 162. – P. 743-746.
14. Van der Linden S., Valkenburg H.A., Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis: a proposal for modification of the New York criteria // Arthritis Rheum. – 1984. – Vol. 27. – P. 361-368.

поступила в редакцию 13.01.2009

отправлена на доработку 03.02.2009

принята к печати 12.02.2009