

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИТЕЛ К КСАНТИНОКСИДАЗЕ В ДИАГНОСТИКЕ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА

**А. В. Александров, С. Г. Мнацаканян, И. Ю. Алехина,
М. А. Махачев, Л. Н. Шилова, И. А. Зборовская**

ГУ НИИ клинической и экспериментальной ревматологии РАМН, кафедра госпитальной терапии ВолГМУ

Впервые для иммунодиагностики ревматоидного артрита (РА) разработана доступная для применения в клинических лабораториях методика иммуноферментного определения уровня антител (Ат) к ксантиноксидазе (КО) на основе иммобилизированной формы магнитоуправляемого сорбента. В сыворотках крови больных РА обнаружены Ат к КО, их концентрация коррелирует с активностью патологического процесса. Выявление Ат к КО в предложенной модификации иммуноферментного анализа может быть использовано в качестве дополнительного теста в комплексной диагностике при уточнении степени активности патологического процесса и выделении клинических форм РА.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, антитела, ксантиноксидаза, иммобилизованные магнитосорбенты.

EVALUATION OF ANTIBODIES TO XANTHINE OXIDASE IN DIAGNOSIS OF RHEUMATOID ARTHRITIS

**A. V. Alexandrov, S. G. Mnatsakanyan, I. Yu. Alekhina,
M. A. Makhachev, L. N. Shilova, I. A. Zborovskaya**

A technique of immunoenzyme evaluation of antibodies (AB) to xanthine oxidase (XO) on the basis of immobilized magnetic sorbents, which may be used in clinical laboratories, was elaborated for the first time. AB to XO were revealed in sera of rheumatoid arthritis (RA) patients, their concentration correlated with the pathologic process activity. Evaluation of AB to XO may be used as complementary test in complex diagnostics in order to characterize the activity of pathologic process and clinical forms of RA.

Key words: rheumatoid arthritis, antibodies, xanthine oxidase, immobilized magnetosorbents.

Не ослабевает интерес к исследованию роли реакций свободнорадикального окисления в развитии ревматоидного артрита (РА). Образующиеся при этом заболевании активные формы кислорода (АФК) могут оказывать патогенное воздействие на биомолекулы и структуры клетки непосредственно, либо иницируя процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ), приводя к деградации коллагена, гиалуроновой кислоты, повреждению соединительной ткани.

В этом аспекте представляются перспективными исследования, направленные на изучение эндогенных факторов, способствующих интенсификации свободнорадикального окисления и ПОЛ.

Одним из таких факторов является ксантиноксидаза (ЕС 1.1.3.22, ксантин-кислород-оксидоредуктаза, КО) — фермент, действующий на заключительном этапе пуринового метаболизма. КО в тканях и биологических жидкостях существует в двух формах: НАД-зависимая форма (Д-форма, ксантиндегидрогеназа, КДГ), окисляющая ксантин с образованием мочевой кислоты (МК) и НАДН, и НАД-независимая (О-форма, оксидаза), окисляющая ксантин до МК и в то же время восстанавливающая молекулярный кислород до супероксидных анионов. По соотношению активности КО и КДГ можно судить о напряженности окислительных и антиоксидантных процессов в организме.

Учитывая характерные иммунологические нарушения при ревматоидном артрите и участие ПМ в патогенезе этого заболевания, можно предположить, что изменение энзиматической активности ряда ферментов ПМ, в том числе КО, может быть обусловлено как влиянием метаболических нарушений, так и гиперпродукцией аутоантител (Ат) к этим ферментам.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Усовершенствовать иммунологическую диагностику РА путем исследования процессов антителообразования к ксантиноксидазе и установить возможные причины изменения активности фермента в сыворотке крови больных воспалительными ревматическими заболеваниями.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Под наблюдением находились 89 больных с достоверным РА по критериям Американской коллегии ревматологов и 30 практически здоровых лиц в возрасте от 24 до 46 лет (19 женщин и 11 мужчин) — доноров станции переливания крови, прошедших обычное обследование.

Среди больных РА было 63 (70,8 %) женщины и 26 (29,2 %) мужчин. Средний возраст больных составил $48,9 \pm 13,2$ года, средняя продолжительность заболевания — $11,14 \pm 2,33$ года. Степень активности пато-

логического процесса определялась в соответствии с диагностическими критериями, рабочей классификацией РА и индексом DAS28 (Disease Activity Score), рекомендованным EULAR. I (минимальная) степень активности выявлена у 17 (19,1 %), II (умеренная) — у 64 (71,9 %) и III (максимальная) — у 8 (9 %) больных РА.

По результатам проведенного комплексного клинико-инструментального и иммуно-биохимического обследования больных РА внесуставные проявления выявлены у 34 (38,2 %) пациентов. Преимущественно наблюдалось комплексное поражение нескольких органов и систем, а внесуставные проявления РА расценивались, в основном, как результат прогрессирования основного заболевания с поражением соединительнотканых структур различных органов.

На основании рентгенологических исследований суставов (по O.Steinbrocker) установлены следующие рентгенологические стадии поражения суставов: I стадия — у 9 (10,1 %), II — у 52 (58,4 %), III — у 24 (26,9 %) и IV — у 4 (4,5 %) больных РА. У большинства больных (91 %) выявлялся полиартрит. У 65 (73 %) больных в крови методом латекс-агглютинации был обнаружен ревматоидный фактор (РФ) класса IgM.

Антитела к КО определялись иммуноферментным методом на микротитрационных полистероловых планшетах Immulon 2 (Dynatech Labs, Германия) с использованием иммобилизированной формы магнитоуправляемого сорбента (МС) на основе ксантиноксидазы в качестве антигенной матрицы. Иммобилизацию антигена (коммерческий препарат КО производства «Sigma», США, Cat. № X2252) проводили методом эмульсионной полимеризации в потоке газообразного азота с включением магнитного материала в структуру полиакриламидного геля по методике И. П. Гонтаря с соавт. (1991) [1]. Результаты учитывали на многоканальном спектрофотометре АС-8К при длине волны 450 нм, полученные значения выражали в условных единицах оптической плотности (е.о.п.). Наличие антител считалось положительным при превышении значений оптической плотности на 2 средних квадратических отклонения от значений контрольной группы (для Ат к КО — более 0,097 е.о.п.).

Активность КО в сыворотке крови определяли по методике Калькара в модификации Е. Г. Дягиной с использованием ксантина [2], а активность КДГ — по методу Z. J. Devenyi с использованием ксантина и окисленной формы НАД [7]. Амплитуда колебаний активности ферментов у здоровых людей по формуле $M \pm 2s$ составила для КО 2,37—4,97 мкмоль/л·мин, для КДГ 4,01—7,41 мкмоль/л·мин, коэффициент КО/КДГ 0,52—0,80.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась на персональном компьютере с использованием пакета «Statistica 6.0 for Windows» и программы «Biostatistics for Windows 4.03». Достоверными считались результаты при уровне $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Применение разработанной модификации иммуноферментного метода позволило выявить в сыворотке крови больных РА антитела к КО в 59,5 % случаев. Данные результаты получены, в основном, благодаря использованию технологии получения МС с применением метода эмульсионной полимеризации, когда водорастворимый антиген — фермент КО — фиксировали в пространственную решетку полиакриламидного геля методом механического включения без образования ковалентных связей. Иммобилизация фермента происходила в поверхностном слое гранулы МС, что позволило создать высокую концентрацию антигена в доступной распознаванию антителами зоне. Кроме того, такой метод приводил к возникновению незначительных конформационных изменений, сохраняющих активность фермента, но, в то же время, способствующих, например, экспрессии гидрофобных участков молекулы энзима, содержащих «скрытые эпитопы».

У больных РА (группа в целом) был выявлен ряд статистически значимых корреляций уровней аутоантител к КО и активности фермента с клиническими и лабораторными показателями (табл. 1).

Таблица 1

Корреляции уровня антител к КО и активности фермента с клиническими и лабораторными показателями у больных РА

Показатели	Активность ксантиноксидазы		Уровень антител к ксантиноксидазе	
	г	р	г	р
Активность РА (индекс DAS28)	0,654*	0,000	0,308*	0,003
Концентрация IgM, г/л	-0,090	0,403	0,370*	0,000
Концентрация IgG, г/л	-0,130	0,486	0,414*	0,000
СОЭ, мм/ч	-0,082	0,661	0,254*	0,022
ЦИК, Ед.	0,260*	0,014	0,265*	0,012
Ксантиндегидрогеназа, (мкмоль/л·мин)	-0,652	0,002	- 0,434*	0,000
Аланинаминотрансфераза, Ед/л	0,165	0,122	0,335	0,001

* — корреляции с достоверностью $p < 0,05$; РА — ревматоидный артрит; IgM — иммуноглобулин класса М, IgG — иммуноглобулин класса G; СОЭ — скорость оседания эритроцитов; ЦИК — циркулирующие иммунные комплексы.

Клинико-лабораторное многообразие РА обусловили целесообразность более детального рассмотрения изучаемых показателей в зависимости от различных клинических форм заболевания, включая активность ревматоидного процесса и наличие внесуставных проявлений (табл. 2).

При I степени активности РА по сравнению со здоровыми лицами обнаружено повышение ферментативной активности КО ($p < 0,001$), КДГ ($p = 0,039$), увеличение соотношения КО/КДГ ($p < 0,001$) и увеличение уров-

ня антител к КО ($p < 0,001$). С нарастанием активности патологического процесса отмечалось увеличение содержания Ат к КО ($p < 0,001$) на фоне снижения биохимической активности КДГ ($p = 0,026$) и роста активности КО ($p = 0,037$). При высокой активности РА тенденция к увеличению активности КО сохранялась ($p = 0,082$), но рост коэффициента КО/КДГ ($p = 0,047$) происходил в основном за счет снижения активности КДГ ($p = 0,041$).

Следует отметить, что у больных с III степенью активности РА были отмечены наиболее высокие уровни антител к КО ($p < 0,001$), кроме того, если у больных РА с низкой активностью патологического процесса антитела к КО выявлялись в низком проценте случаев (29,4 %), у больных с умеренной активностью — в 67,2 %, то при высокой активности заболевания частота положительных результатов достигала 100 %.

Таблица 2

Показатели содержания Ат к КО и активности фермента в сыворотке крови больных РА в зависимости от активности патологического процесса и клинко-анатомической формы заболевания ($M \pm s$)

Контингент обследуемых	Число наблюдений	Активность КО	Активность КДГ	Коэффициент КО / КДГ	Ат к КО
Здоровые	30	$3,67 \pm 0,65$	$5,71 \pm 0,88$	$0,66 \pm 0,05$	$0,032 \pm 0,022$
<i>Активность ревматоидного артрита</i>					
I степень	17	$5,69 \pm 1,40$	$6,24 \pm 0,70$	$0,95 \pm 0,29$	$0,081 \pm 0,015$
II степень	64	$7,59 \pm 3,60$	$5,42 \pm 1,44$	$1,61 \pm 1,12$	$0,143 \pm 0,045$
III степень	8	$9,87 \pm 1,30$	$4,35 \pm 0,34$	$2,42 \pm 0,31$	$0,211 \pm 0,016$
<i>Форма ревматоидного артрита</i>					
Суставная	55	$5,55 \pm 1,85$	$6,27 \pm 1,41$	$0,91 \pm 0,37$	$0,121 \pm 0,044$
С системными проявлениями	34	$9,27 \pm 2,51$	$4,77 \pm 0,93$	$2,12 \pm 1,67$	$0,163 \pm 0,052$

Снижение активности КДГ на фоне повышенной активности КО при воспалительных ревматических заболеваниях происходит, по-видимому, за счет трансформации Д-формы КО в О-форму при нарастании воспалительных явлений в тканях, гипоксии, а также за счет повышения активности протеолитических энзимов в очагах воспаления и свидетельствует о существенном увеличении генерации супероксидных радикалов. Учитывая выявленную тесную взаимосвязь иммунологической и ферментативной активности КО роль аутоантител к КО в данной трансформации представляется весьма вероятной и может выражаться в непосредственном воздействии на активный и/или аллостерический центр молекулы энзима.

Повышенные уровни Ат к КО определялись у 47,3 % пациентов с суставной формой заболевания и у 79,4 % — в группе больных с системными проявлениями РА. Сравнение между собой групп больных РА, позитивных (53 человека) и негативных (36 человек) по антителам к КО, продемонстрировало большую тяжесть поражения нервной системы (c^2 с поправкой Йетса = 7,58, $p = 0,006$) и органов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) (c^2 с поправкой Йетса = 5,06, $p = 0,0245$) (табл. 3).

Изучение связи аутоантител к КО с клиническими вариантами РА представляет большой интерес, так как различия в клинике у пациентов позитивных и негативных по данным антител могут быть связаны с повреждающими эффектами антител на те или иные органы и ткани.

Роль аутоантител к КО в поражении нервной системы может быть связана с несколькими механизмами. Принято считать, что АФК играют основную роль в повреждении мембран нервных клеток [4].

Таблица 3
Частота поражения внутренних органов у больных РА с различным уровнем антител к ксантиноксидазе

Клинические проявления	Частота выявления (абсолютное количество и %)		Достоверность	
	Позитивные по Ат к КО	Негативные по Ат к КО	Хи-квадрат	Фи-квадрат
Поражение нервной системы	12 (13,48%)	0	$\chi^2 = 9,42$ $p = 0,002$	0,1059
Поражение сердца	8 (8,08%)	2 (2,02%)	$\chi^2 = 1,29$ $p = 0,257$	0,0130
Поражение ретикуло-эндотелиальной системы	10 (11,24%)	1 (1,12%)	$\chi^2 = 5,12$ $p = 0,024$	0,0576
Поражение органов ЖКТ	9 (10,11%)	0	$\chi^2 = 6,80$ $p = 0,009$	0,0764
Поражение почек	9 (10,11%)	3 (3,37%)	$\chi^2 = 1,37$ $p = 0,241$	0,0154

При воспалительных и гипоксических состояниях, особенно при ишемии-реперфузии, имеющей место при транзиторных нарушениях кровоснабжения, возможна трансформация Д-формы (КДГ) в О-форму (КО), которая в процессе катализа усиленно продуцирует супероксидные радикалы, оказывающие повреждающее действие на клеточные мембраны, содержащее клетки и интенсифицирующие процессы перекисного окисления липидов [5, 9]. Также нельзя исключить возможность перекрестного реагирования антител к КО с рецепторами нейронов, с последующим изменением их функциональной активности, как это было продемонстрировано для антител к ДНК и NMDA-

рецепторов [8]. В целом даже незначительное уменьшение функциональной активности КДГ на фоне роста активности КО под влиянием аутоантител может приводить к накоплению АФК в нейронах и нарушению их функции.

Наряду с этим известны случаи ксантиноксидазной недостаточности, комбинирующиеся с дефицитом сульфитоксидазы и молибдена, что проявляется выраженными неврологическими нарушениями [10].

Связь наличия аутоантител к КО с тяжестью проявлений со стороны ЖКТ может объясняться как участием аутоантител в повреждении тканей [3], так и с ингибированием аутоантителами защитных механизмов слизистых. Непрямое повреждающее действие аутоантител может быть связано с ролью АФК в поражении ЖКТ, индуцируемого лекарственными средствами (например нестероидными противовоспалительными препаратами) и недостаточностью антиоксидантных ферментов в защите от таких повреждений, вызванной ингибирующим действием КО [6, 11].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При РА обнаружена новая группа аутоантител — антитела к ксантиноксидазе, определение которых в сыворотке крови иммуноферментным методом с использованием иммобилизированной формы магнитоуправляемого сорбента может использоваться для уточнения отдельных звеньев патогенеза РА, а также для улучшения качества иммунодиагностики данного заболевания. Полученные результаты позволяют рассматри-

вать совместное определение активности КО, КДГ и антител к ксантиноксидазе в качестве дополнительных диагностических критериев при уточнении степени активности патологического процесса и выделении клинических форм РА.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гонтарь И. П., Зборовский А. Б., Левкин С. В. и др. Способ получения магнитных полиакриламидных гранул. — Авторское свидетельство на изобретение № 1582657. — 1990.
2. Дягина Е. Г. // Лаб. дело. — 1973. — № 11. — С. 647—649.
3. Ballot E., Bruneel A., Labas V., et al. // Clin. Chem. — 2003. — Vol. 49, № 4. — P. 634—643.
4. Balu M., Sangeetha P., Haripriya D., et al. // Neurosci Lett. — 2005. — Vol. 383, № 3. — P. 295—300.
5. Berman R. S., Martin W. // Br. J. Pharmacol. — 1993. — Vol. 108, № 4. — P. 920—926.
6. Burak Cimen M. Y., Cimen O.B., Eskandari G., et al. // Drug Chem. Toxicol. — 2003. — Vol. 26, № 3. — P. 169—176.
7. Devenyi Z. J., Orchard J. L., Powers R. E. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. — 1987. — Vol. 149, № 3. — P. 841—843.
8. Kotzin B. L., Kozora E. // Nat. Med. — 2001. — Vol. 7, № 11. — P. 1175—1176.
9. Punch J., Rees R., Cashmer B., et al. // Surgery. — 1992. — Vol. 111, № 2. — P. 169—176.
10. Roesel R. A., Bowyer F., Blankenship P. P., et al. // J. Inherit. Metab. Disease. — 1986. — Vol. 9, № 4. — P. 343—347.
11. Zahavi I., Fisher S., Marcus H., et al. // J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. — 1995. — Vol. 21, № 2. — P. 154—157.