

ЗНАЧЕНИЕ АНТИТЕЛ К ЭРИТРОЦИТАРНОЙ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЕ В ИЗМЕНЕНИИ ЕЕ АКТИВНОСТИ ПРИ СИСТЕМНОЙ СКЛЕРОДЕРМИИ

Л. Н. Шилова, Н. Н. Емельянов

Кафедра госпитальной терапии ВолгГМУ,

Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии

Для первичной иммунной диагностики системного склероза была разработана методика иммуноферментного определения уровня антител к супероксиддисмутазе (СОД) с использованием иммобилизованных антигенных форм энзимов. В крови больных с системной склеродермией выявляются антитела к СОД, продукция которых увеличивается с возрастанием активности процесса, наличием более тяжелых форм течения заболевания и сопровождается со снижением активности фермента. Следовательно, одной из причин угнетения антиоксидантной активности СОД, вероятно, могут явиться аутоантитела к энзиму.

Ключевые слова: ревматический процесс, системная склеродермия, аутоантитела, антиоксидантная система, супероксиддисмутаза.

IMPORTANCE OF ANTIBODIES TO ERYTHROCYTAL SUPEROXIDE DISMUTASE IN CHANGE OF ITS ACTIVITY IN SYSTEMIC SCLEROSIS

L. N. Shilova, N. N. Emeljanov

A technique of immunoenzyme diagnostics of the level of antibodies to Superoxide Dismutase (SOD) on the basis of an immobilized form of magnet sorbent was developed for immune diagnostics of systemic sclerosis (SS) for the first time. Antibodies to SOD were found in sera of SS patients, their concentration correlates with the activity and course of disease. It is shown that the level of antibodies to SOD reliably differs from content of these antibodies in sera of healthy individuals. Detection of antibodies to SOD by means of the proposed method can be used as one of tests for SS diagnostics to determine the extent and course of the disease. The data we obtained demonstrate that antibodies to SOD invoke a decrease of enzymatic activity in vitro. Therefore the antibodies to enzyme may be one of the possible causes of decrease of SOD activity in patients.

Key words: rheumatic process, systemic sclerosis, autoantibodies, antioxidant system, Superoxide Dismutase.

Существуют различные теории патогенеза ревматических заболеваний, основывающиеся на дисрегуляции иммунных реакций организма, наличии энзимных дефектов, метаболических нарушениях, но все они не дают полного представления о патогенезе данной патологии. В настоящее время доказана важная роль дисбаланса между процессами оксидации и антиоксидации в развитии и поддержании хронического ревматического воспаления [5, 7, 9]. Так, например, в различных работах показано снижение активности некоторых ферментов антиоксидантной системы (АОС) при ревматоидном артрите, системной красной волчанке, системной склеродермии и др. [1]. Одним из механизмов нарушения работы ферментных систем могут быть аутоантитела к энзимам.

Системная склеродермия (ССД) — один из наиболее ярких примеров ревматической патологии, который характеризуется как прогрессирующее полисиндромное заболевание с характерными изменениями кожи, опорно-двигательного аппарата, внутренних органов и распространенными вазоспастическими нарушениями по типу синдрома Рейно [1, 3, 8]. Основу патогенеза ССД, как известно, составляют нарушения иммунитета, фиброзообразования и микроциркуляции [6].

Супероксиддисмутаза (ЕС 1.15.1.1) — один из мощных ингибиторов окислительных процессов, осуществляющий рекомбинацию супероксидных радика-

лов с образованием перекиси водорода и кислорода [2]. Фермент стабилизирует структурную организацию клеточных мембран, предотвращает лизис эритроцитов. Рассмотрим изменения активности супероксиддисмутазы (СОД) на примере ССД.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Выявление антител к СОД в крови больных ССД в зависимости от разных клинических форм патологии, а также изучение влияния специфических антител на энзиматическую активность фермента.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Под наблюдением находилось 35 больных с достоверным диагнозом ССД и 30 практически здоровых лиц — доноров станции переливания крови, в возрасте от 25 до 47 лет, среди которых 17 женщин и 13 мужчин.

Больные системной склеродермией

Среди обследованных больных ССД было 33 (94,3 %) женщины и 2 (5,7 %) мужчины. Средний возраст больных ($38 \pm 3,3$) лет, продолжительность болезни ($14 \pm 2,6$) лет. 24 (68,6 %) из наблюдавшихся больных имели лимитированную форму болезни, 11 (31,4 %) — диффузную.

I степень активности установлена у 13 (37,1 %), II — у 21 (60 %), III — у 1 (2,9 %) больного.

Хроническое течение выявлено у 14 (40 %) пациентов, подострое — у 20 (57,1 %), острое — у 1 (2,9 %). Больные с подострым и острым течением заболевания, II и III степенями активности в дальнейшем будут рассматриваться в одной группе вследствие малого количества больных с острым течением и III степенью активности.

I стадия заболевания (начальная) диагностирована у 9 (25,7 %) больных, II (генерализованная) — у 23 (65,7 %), III (терминальная) — у 3 (8,6 %).

Антитела к СОД определяли в сыворотке крови больных по разработанной нами методике непрямого иммуноферментного анализа с использованием иммобилизованных антигенных форм энзимов (Гонтарь И. П., 2001). Иммобилизацию проводили методом эмульсионной полимеризации в потоке газообразного азота с включением магнитного материала в структуру полиакриламидного геля. Положительными считались результаты, превышающие 2 стандартных отклонения показателей, полученных при обследовании здоровых лиц. Все исследования проводились при поступлении и при выписке из стационара после завершения лечения. В качестве антигена при определении антител к СОД использовали коммерческий препарат СОД из эритроцитов человека производства НПО «Биопрепарат» с активностью 30 Ед/мг, активность СОД определяли по методу Чевари С. и соавт. (1993).

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программных пакетов «STATISTICA 6.0», «Excel 5.0», «STATGRAPHICS 3.0».

Изучение влияния антител к СОД проводили с растворимой и иммобилизованной формой фермента. Источником специфических иммуноглобулинов служили сыворотки больных ССД с заранее высоким титром антител (экстинкция более 0,18). «Чистые» антитела к эритроцитарной СОД получали с помощью соответствующего антигенного иммуносорбента. После соответствующего диализа против забуференного физиологического раствора и последующего концентрирования через полупроницаемую мембрану системы «Sartorius» до первоначального объема сыворотки антитела использовали в эксперименте по изучению их взаимодействия с ферментом.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Здоровые лица. При исследовании сывороток здоровых лиц уровень антител к СОД составил $0,06 \pm 0,004$. Показатели, превышающие эти значения на величину 2 стандартных отклонений, были приняты за верхнюю границу нормы: для АТ к СОД — 0,104. Общая активность СОД в группе здоровых лиц составила $(38,2 \pm 1,2)$ МЕ, амплитуда колебаний величины активности составила 25,1—51,28 МЕ. Существенных различий уровня антител к энзимам в зависимости от пола, возраста не выявлено.

Больные ССД. При поступлении на стационарное лечение у больных ССД наблюдалось достовер-

ное снижение активности СОД ($22,6 \pm 2,4$, $p < 0,002$), причем отмечалась тенденция к более выраженному снижению активности по мере нарастания активности процесса (табл. 1). У больных ССД (группа в целом) антитела к СОД выявлены у 14 больных (40 %).

При минимальной степени активности патологического процесса (13 человек) высокие уровни антител к СОД выявлены у 4 (30,8 %) больных. При ССД со II и III степенями активности (22 больных) по сравнению со здоровыми выявлено снижение активности и СОД и увеличение уровня антител ($p < 0,002$), отмечается увеличение количества больных, в сыворотке которых выявлены высокие уровни антител: к СОД — у 10 (45,5 %) больных (табл. 1).

При анализе группы больных ССД, в крови которых обнаружены высокие уровни антител к СОД (14 человек, 40 %), получено достоверное снижение активности ферментов ($p < 0,05$), в то время как в крови больных с низким содержанием антител достоверного снижения активности энзимов не было.

В группе больных ССД с разным характером течения болезни (табл. 1) нами выявлены достоверно более высокие уровни антител к ферментам по сравнению со здоровыми ($p < 0,05$), при подостром и остром течении процесса ($p < 0,05$), по сравнению с хроническим. Активность СОД достоверно снижалась как при хроническом, так и при подостром течении процесса ($p < 0,02$). Высокие уровни антител к СОД обнаружены у 4 (28,6 %) больных с хроническим течением и у 10 (47,6 %) — с подострым. В группах больных с высоким уровнем антител к ферментам отмечено достоверное снижение активности энзимов, в то время как у больных с низким значением антител — лишь тенденция к снижению.

Таблица 1

Показатели активности СОД и содержание антител к СОД в сыворотке крови здоровых лиц и больных ССД в зависимости от активности процесса

Контингент	Число наблюдений	Статист. показатели	Активность СОД	Антитела к СОД
Здоровые	30	M	38,2	0,06
		σ	6,54	0,022
		m	1,2	0,004
Больные I ст.	13	M	25,1	0,110
		σ	11,5	0,011
		m	3,2	0,003
Больные со II—III ст.	22	M	20,2	0,21
		σ	12,7	0,014
		m	2,7	0,003
Больные с хроническим течением	14	M	24,6	0,11
		σ	7,8	0,011
		m	2,1	0,003
Больные с подострым, острым течением	21	M	21,3	0,173
		σ	9,7	0,009
		m	2,1	0,002

Определяя ферментативную активность иммобилизированной формы СОД после предварительного взаимодействия с «чистыми» антителами к эритроцитарной СОД, обнаружили снижение активности фермента на 98 % по сравнению с контролем. Эта динамика происходит, вероятно, вследствие блокирования антителами активного центра фермента, являющегося и антигенной детерминантой. При определении активности растворимой формы СОД после взаимодействия со специфическими антителами выявлено снижение активности фермента на 65 %. Полученные данные показывают, что выявляемые антитела к СОД снижают активность энзима, кроме того, в опыте с растворимой формой СОД после взаимодействия со специфическими антителами сохраняется более высокая активность фермента, чем при его иммобилизации (табл. 2).

Таблица 2

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

СОД	Активность фермента (в 1 мл) после взаимодействия с антителами	Активность фермента (в 1 мл) — доноры	Активность фермента (в 1 мл) — физ. раствор
Иммобилизованная	0,340 ± 0,002	33,40 ± 0,14	37,30 ± 0,05
Растворимая	13,30 ± 0,07	32,3 ± 0,1	37,50 ± 0,07

Это можно объяснить, вероятно, тем, что включение фермента в жесткую структуру полиакриламидного геля позволяет исключить какие-либо конформационные изменения структуры молекулы при взаимодействии с антителами, вследствие чего происходит более полное блокирование антигенных детерминант, совпадающих с активным центром энзима. Взаимодействие растворимой формы фермента с антителами, вероятно, сопровождается конформационными изменениями структуры молекулы, в результате сохраняется актив-

ность фермента, кроме того, при образовании комплекса антиген(СОД)-антитело появляется СОД-активность, свойственная, по данным литературы, любому иммунному комплексу.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в крови больных с системной склеродермией выявляются антитела к СОД, 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 СОД, вероятно, могут являться аутоантитела к энзиму.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гусева Н. Г. // РМЖ. — 2000. — Т. 8, № 9.
2. Зборовская И. А. Ревматические болезни и антиоксидантная система. — М.: «Медицина», 2005. — 127 с.
3. Малахов А. Б., Давтян В. Г., Геппе Н. А., Осминина М. К. // Consilium medicum. — 2006. — Т. 8, № 2.
4. Artlett C. M. // Front. Biosci. — 2005. — Vol. 10. — P. 1707—1719.
5. Chung C. P., Avalos I., Stein C. M. // Free Radic. Biol. Med. — 2006. — May 15. — Vol. 40(10). — P. 1698—1699.
6. Denton C. P., Black C. M., Abraham D. J. // Nat. Clin. Pract. Rheumatol. — 2006. — Mar. — Vol. 2(3). — P. 134—144.
7. Dooley A., Gao. B., Bradley N., et al. // Annals of the New York Academy of Sci. — 2005. — Jun. — Vol. 1051. — P. 455—464.
8. Johnson S. R., Glaman D. D., Schentag C. T., Lee P. // J-Rheumatol. — 2006. — Jun. — Vol. 33(6). — P. 1117—1122.
9. Tikly M., Channa K., Theodorou P., Gulumian M. // Clin. Rheumatol. — 2006. — May. — Vol. 25(3). P. 320—324.

Контактная информация

Шилова Людмила Николаевна — ассистент кафедры госпитальной терапии ВолгГМУ, e-mail: ludshilova@mail.ru