

УДК 577.112:612.115

## АУТОІМУННІ АНТИТІЛА ДО КЛЮЧОВИХ КОМПОНЕНТІВ СИСТЕМИ ЗСІДАННЯ КРОВІ, ЯКІ УТВОРЮЮТЬСЯ В КРОВОТОЦІ ПРИ СИСТЕМНОМУ ЧЕРВОНОМУ ВОВЧАКУ

Вовк Т.Б., Савчук О.М., Остапченко Л.І.

ННЦ "Інститут біології" Київського національного університету імені Тараса Шевченка

Надійшла до редакції 22.03.2010

Системний червоний вовчак (СЧВ) характеризується порушенням функціонування системи зсідання крові і часто супроводжується виникненням тромбозів. Причиною цього можуть виступати аутоантитіла, які утворюються протягом розвитку патології. Представлена стаття присвячена отриманню і характеристиці фракцій аутоантитіл із крові хворих на СЧВ та дослідженню їх впливу на окремі фактори системи гемостазу. В результаті проведених досліджень було встановлено, що в присутності аутоантитіл знижується швидкість активації ключових параметрів згортання - фактору X та протромбіну. Отримані дані будуть в подальшому використані для більш повної характеристики участі аутоантитіл в патологічних процесах зсідання крові, що спостерігаються при захворюванні на СЧВ.

**Ключові слова:** аутоантитіла, системний червоний вовчак, система зсідання крові.

### ВСТУП

Системний червоний вовчак — аутоіммунне захворювання, що має різноманітні клінічні прояви і характеризується появою в кровотоці аутоантитіл до ядерних антигенів власного організму. Встановлено, що захворюваність СЧВ жінок в 10 разів вища, ніж у чоловіків. Також є дані про значення етнічних ознак, генетичної схильності та індивідуальної чутливості до умов навколишнього середовища при захворюванні на СЧВ [1]. Механізмом розвитку СЧВ є поліклональна активація В-лімфоцитів та продукція аутоантитіл, які зумовлюють ураження практично всіх органів, в результаті чого захворювання набуває полісистемного характеру. Причиною смертності при СЧВ здебільшого є артеріальні та венозні тромбози, які виникають при порушенні системи гемостазу [2]. У хворих на СЧВ відмічено такі асоційовані захворювання, як тромбофілічний синдром, антифосфоліпідний синдром, гомоцистеїнемія, гіперфібриногенемія, хвороба фон Віллебранда та ін. [3-5]. Причин розвитку супутніх хвороб при СЧВ може бути багато, оскільки утворення антиядерних аутоантитіл веде до порушення клітинної імунорегуляції, що в свою чергу призводить до патологій різних органів і систем, в тому числі серцево-судинної. СЧВ характеризується порушенням функціонування системи зсідання крові і часто супроводжується виникненням тромбозів [6]. Відомо, що аутоантитіла, які виникають при СЧВ, змінюють певні показники системи гемостазу. Зокрема, антифосфоліпідні антитіла викликають підвищення таких показників, як активований частковий тромбопластиновий час і протромбіновий час, та можуть стати причиною виникнення різних

патологічних станів [7]. Є дані про зростання рівня фібриногену в крові хворих на СЧВ разом із розвитком цього захворювання [5]. Також встановлено, що при СЧВ зростає позаклітинне фосфорилування білків плазми (включаючи фібриноген і С3 компонент системи комплементу), що корелює із активацією тромбоцитів [8]. Останнім часом досить багато досліджень продемонстрували участь антифосфоліпідних антитіл у розвитку тромбозів при СЧВ, але досі залишається незрозумілим механізм дії цих антитіл. У зв'язку з цим, вивчення впливу аутоантитіл на функціонування системи гемостазу дозволить з'ясувати механізми їх дії та розробити діагностичні тести для виявлення накопичення антитіл на початкових етапах розвитку хвороби.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Для дослідження впливу антитіл на активацію окремих компонентів системи зсідання крові у 37 хворих відбирали кров за допомогою пункції із ліктьової вени. Отриману кров змішували з 3,8% розчином цитрату натрію в пропорції 9:1. Для отримання плазми кров центрифугували при 1200g [9].

Для одержання фракції антитіл використовували метод афінної хроматографії на протеїн А сефарозі [10]. На колонку з протеїн А сефарозою наносили 300-400 мкл плазми крові (загальний об'єм колонки 1.5 мл). Відмивали неспецифічно зв'язані білки десятима об'ємами колонки 0.05 М фосфатним буфером, рН 7.4. Елюцію проводили гліциновим буфером (100 мМ гліцин-HCl, рН 2.2). Фракції збирали по 1 мл та вимірювали оптичну густину отриманих антитіл. Проби, які містили білок, об'єднували та висолювали

розчином сульфату амонію до кінцевої концентрації 45 % і при температурі 4°C залишали на ніч. Після цього центрифугували на РС-6 при 3000 об./хв 30 хв, супернатант відкидали, а осад розчиняли в 1 мл 0,05 М фосфатного буферу, рН 7,4. Для позбавлення залишків сульфату амонію, розчин антитіл наносили на колонку з сефадексом G 25, врівноважену 0,05 М фосфатним буфером, рН 7,4. Фракції збирали по 1 мл і вимірювали концентрацію антитіл при 280 нм. Проби, які містили білок, об'єднували, концентрували, вимірювали оптичну густина і знаходили концентрацію. Для додаткової очистки від важких та легких ланцюгів імуноглобулінів використовували хроматографію, що поділяє за розмірами, на колонці з сорбентом Sephadex G75. В роботі використовували 0,05 М трис-НСІ буфер, рН 7,4.

Для перевірки чистоти отриманих антитіл проводили диск-електрофорез у 7,5% поліакриламідному гелі з SDS за методом Лемлі [11]. Для відновлення дисульфідних зв'язків застосовували 5% β-МЕ. Суміш білків (Amersham Biosciences) з молекулярними масами 94 кДа (фосфорилаза В), 67 кДа (альбумін), 43 кДа (овальбумін), 30 кДа (ангідроза), 20,1 кДа (соевий інгібітор трипсину), 14,4 (лактальбумін) використовували як маркери. Електрофорез проводили у апараті для вертикального гель-електрофорезу (Amersham Biosciences) у пластинах завтовшки 0,75 або 1,5 мм за 4°C. Гелі фарбували 0,125% розчином кумасі G-250 у 25% ізопропанолі та 10% оцтової кислоти.

Визначення концентрації антитіл в крові хворих на СЧВ проводили за методикою [12].

Активацію протромбіну проводили за методикою [13]. Для дослідження впливу антитіл на активацію протромбіну використовували модельну систему, яка включала 10 мкл 0,025 М CaCl<sub>2</sub>, 10 мкл екамуліну, 25 мкл 2,5 мМ хромогенного субстрату протромбіну S<sub>2238</sub> та 0,05 М трис-НСІ буфер, рН 7,4, що містить 0,13 М NaCl, а також виділені за допомогою афінної хроматографії антитіла у кількості 30 мкг. Як позитивний контроль використовували цю ж модельну систему, яка не містила антитіл. Суміш ставили на інкубацію при температурі 37°C, активацію визначали спектрофотометрично за розщепленням хромогенного субстрату тромбіну кожні 5 хв інкубації при довжині хвилі 405 нм на мікропланшетному спектрофотометрі Multiskan EX. Модельна система з використанням плазми крові відтворює фізіологічні умови протікання процесу, але разом з тим в тест з плазмою вносяться білки, які впливають на результат експерименту. Тому для підтвердження впливу антитіл на активацію протромбіну була запропонована інша модельна система: для активації чистого препарату протромбіну складали суміш загальним об'ємом 250 мкл: 1,6 мкг білку, 10 мкл 0,025 М CaCl<sub>2</sub>, 10 мкл екамуліну, 25 мкл

2,5 мМ хромогенного субстрату протромбіну S<sub>2238</sub> та 0,05 М трис-НСІ буфер, рН 7,4, що містить 0,13 М NaCl. Спонтанну активність препаратів перевіряли в системі, що не містить екамулін. Суміші ставили на інкубацію при температурі 37°C, активацію визначали спектрофотометрично за розщепленням хромогенного субстрату тромбіну кожні 5 хв. інкубації при довжині хвилі 405 нм на мікропланшетному спектрофотометрі Multiskan EX.

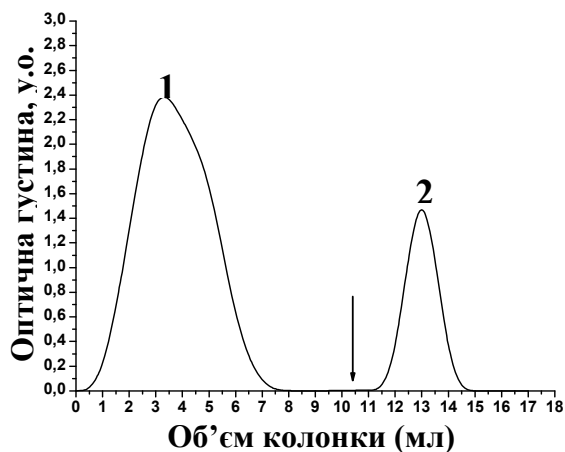
Для активації фактору X в плазмі крові використовували активатор X фактору, виділений з отрути гадюки Рассела (RVV). Для визначення впливу антитіл на активацію X фактору використовували модельну систему, що включала 5мкл плазми донорів, 30 мкг антитіл, 10 мкл 0,025 М CaCl<sub>2</sub>, 10 мкл активатору з отрути гадюки Рассела (RVV), 25 мкл 2,5 мМ хромогенного субстрату протромбіну S<sub>2765</sub> та 0,05 М трис-НСІ буфер, рН 7,4, що містить 0,13 М NaCl. Суміш ставили на інкубацію при температурі 37°C, активацію визначали спектрофотометрично за розщепленням хромогенного субстрату тромбіну кожні 5 хв інкубації при довжині хвилі 405 нм та 492 нм на мікропланшетному спектрофотометрі Multiskan EX. Спонтанну активність препаратів перевіряли в системі, що не містить RVV [14].

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Системний червоний вовчак (СЧВ) – мультисистемне захворювання сполучної тканини, що характеризується гетерогенною поліклональною аутоімунною відповіддю, внаслідок чого можливі артеріальні, венозні та мікросудинні тромбози. У третини хворих на СЧВ розвивається антифосфоліпідний синдром [15]. Антифосфоліпідний синдром (АФЛС) імунопатологічний процес, який викликано утворенням аутоантитіл (АФА), що мають широкий діапазон специфічності і спорідненості до різних фосфоліпідів, фосфоліпідзв'язуючим білком або до тих і інших. Найважливішими аутоантитілами, які беруть участь в патогенезі СЧВ та асоційованого з ним антифосфоліпідного синдрому (АФС) є антитіла до подвійної спіралі ДНК (anti-dsDNA) та антифосфоліпідні антитіла (АФА) відповідно. Проте не всі anti-dsDNA та АФА можуть спричинити клінічні прояви хвороби. До антитіл, які лежать в основі ушкодження тканин та органів при СЧВ та АФС відносяться тільки імуноглобуліни типу G [16]. Тому для виділення цих антитіл із крові хворих на СЧВ було обрано метод афінної хроматографії на протеїн А сефарозі. Даний носій зв'яже виключно антитіла класу G.

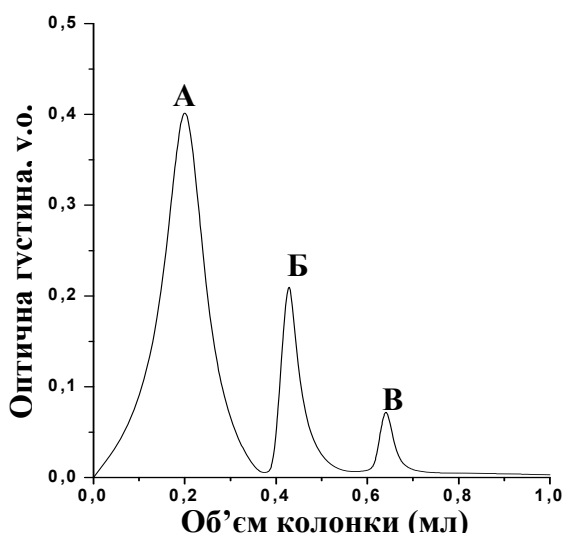
На рис. 1 показано хроматограму розділення сироватки крові хворих з СЧВ на протеїн А сефарозі. Зважаючи на умови проведення даного виду хроматографії 2 пік представляє собою практично чисту фракцію імуноглобулінів класу G, що містяться в сироватці.

Для позбавлення можливих домішок важких та легких ланцюгів імуноглобулінів класу G в отриманих зразках сироватки крові проводили хроматографію, що поділяє за розмірами, на колонці з сорбентом Sephadex G75. На хроматограмі отримали 3 піки (рис. 2). Пік А відповідає молекулярній масі 150 кДа і в цій фракції містяться імуноглобуліни G. Піки Б і В відповідають молекулярним масам 50 кДа і 25кДа які швидше за все, представляють окремі важкі і легкі ланцюги імуноглобулінів, які циркулюють в кровотоці.



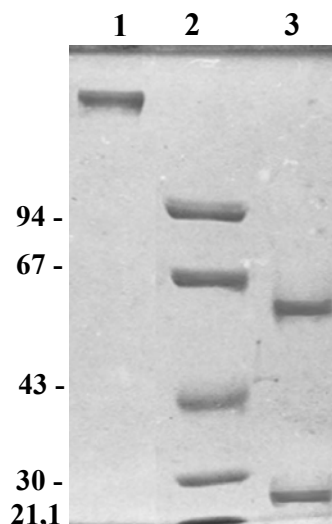
**Рис. 1.** Хроматограма отримання антитіл класу G з плазми крові хворих на СЧВ.

*Примітки:* 1 – незв'язана частина плазми; 2 – фракція імуноглобулінів G; стрілкою відмечено зміну 50 мМ Na-фосфатному буферу, рН 7,4 на елюючий буфер 100 мМ гліцин-НСІ буфером, рН 2,2



**Рис. 2.** Хроматограма фракції імуноглобулінів G на колонці Sephadex G75.

*Примітки:* А – фракція, що містить імуноглобуліни G; Б – фракція, що містить важкі ланцюги імуноглобулінів G; В – фракція, що містить легкі ланцюги імуноглобулінів G



**Рис. 3.** Електрофореграма антитіл, які були отримані методом афінної хроматографії на колонці з протеїн А сефарозою.

*Примітки:* 1 – нативні антитіла; 2 – маркери молекулярної ваги; 3 – антитіла в присутності β-ME (важкі та легкі ланцюги)

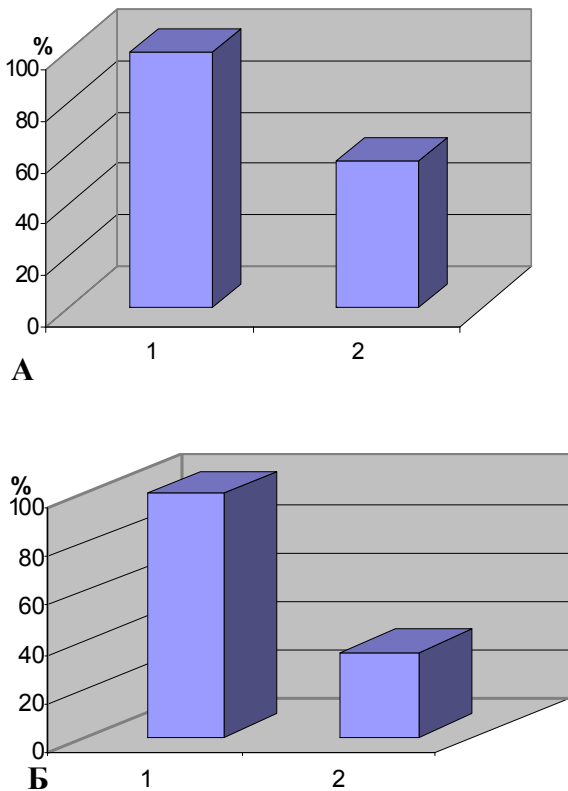
Методом диск-електрофорезу в ПААГ із SDS було показано, що отриманий елюат містить білок, який по молекулярній масі відповідає антитілам класу G (рис. 3). За відсутності β-меркаптоетанолу білкова фракція мала характерну для імуноглобулінів молекулярну вагу 150 кДа, при відновленні дисульфідних зв'язків β-меркаптоетанолом утворювалися фрагменти з молекулярною вагою 26 (легкий ланцюг) і 55 (важкий ланцюг) кДа. Електрофоретичний аналіз також показав відсутність у фракціях інших білків. Проведене дослідження концентрації антитіл в плазмі 37 хворих на системний червоний вовчак показало, що в 1мл плазми накопичується від 2,9 мг до 14,6 мг аутоантитіл (у середньому – 5,7 мг). Плазми крові хворих були розділені на 3 групи залежно від концентрації антитіл (табл. 1).

**Таблиця 1.**  
Коливання вмісту антитіл в плазмах крові хворих на СЧВ

	Концентрація (мг/мл)	%
1 група	2 – 5	21.6
2 група	5 – 7	27
3 група	> 7	51.4

Як видно з таблиці 1, концентрація антитіл значно коливається у різних пацієнтів, причиною цього є індивідуальні особливості розвитку хвороби в кожного хворого на СЧВ. Отримані та охарактеризовані антитіла далі використовувалися для дослідження їх впливу на окремі параметри системи гемостазу.

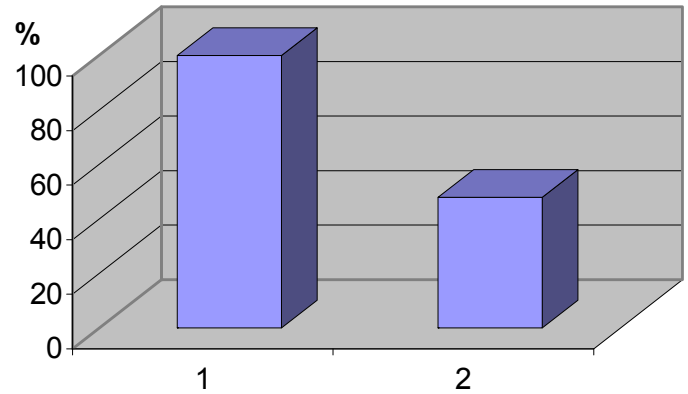
У системі зсідання крові одним із ключових факторів є тромбін, який проявляє специфічні протеолітичні та гормоноподібні функції. Він впливає на три ланки гемостазу: тромбоцитарний апарат, судинну стінку та плазмові фактори згортання крові. Тому активація тромбіна є важливим регуляторним процесом, який забезпечує підтримання гемостазу. Активна форма фактора X – фактор Xa разом із фактором Va та фосфоліпідною мембраною активують протромбін, а сам фактор X є ключовим фактором, на якому сходяться зовнішні та внутрішні шляхи системи згортання крові [17]. Через такі особливості саме протромбін та фактор X системи згортання крові були обрані для дослідження впливу на них аутоімунних антитіл, які утворюються протягом розвитку СЧВ та швидше за все призводять до порушень системи гемостазу організму.



**Рис. 4.** Вплив антитіл на активацію протромбіну екамуліном (А – в плазмі крові, Б – чистого протромбіну)  
Примітки: 1 – контроль 2 – хворі на СЧВ.

Після проведених досліджень виявилось, що швидкість активації протромбіну екамуліном під впливом антитіл у хворих на СЧВ знижується на 43% порівняно із контролем (рис. 4).

Дослідження впливу аутоімунних антитіл хворих на СЧВ на активацію X фактору показали значне сповільнення (на 48%) активації X фактору активатором з отрути гадюки Рассела в присутності антитіл порівняно з контрольною групою (рис. 5).



**Рис. 5.** Вплив антитіл на активацію X фактору  
Примітки: 1 – контроль 2 – хворі на СЧВ

Отримані дані щодо пригнічення активації X фактору та протромбіну за присутності аутоантитіл добре узгоджуються з даними літератури, оскільки відомий антикоагулянтний ефект АФА: інгібування активації фактора IX, активації фактора X та перетворення протромбіну в тромбін [18]. Отже, отримані дані свідчать про пролонгуючий вплив очищених аутоантитіл на проферменти системи гемостазу. За фізіологічних умов такий вплив може призвести до серйозних порушень згортання крові, тромбозів або навпаки до крововиливів, тому що невідомо, яким чином аутоантитіла впливають на інші ланки системи гемостазу і до яких саме наслідків може призвести їх дія. З даних літератури відомо, що при АФЛС відбувається інгібування активованого протеїну С, фібринолізу, антитромбіну III, антикоагулянтної активності  $\beta_2$ -глікопротеїна I. АФЛС супроводжується підвищенням експресії адгезивних молекул ендотеліальними клітинами та прилипанням нейтрофілів і лейкоцитів до ендотеліальних клітин, активацією і дегрануляцією нейтрофілів, посиленням активації та агрегації тромбоцитів, руйнування вбудованого в мембрану аннексина V, посиленням зв'язування  $\beta_2$ -глікопротеїну I з мембранами [19]. Залишається відкритим питання про участь аутоімунних антитіл у цих процесах і потребує подальших досліджень.

## ВИСНОВКИ

Нами було отримано очищені аутоімунні антитіла із крові хворих на СЧВ і показано їх пролонгуючий ефект на активацію окремих проферментів системи гемостазу. Отримані дані є важливим підґрунтям у подальшому вивченні причин і механізмів розвитку тромботичних ускладнень, які є основною причиною смертності хворих на СЧВ та АФЛС.

## Література

1. Jessica J Manson and Anisur Rahman Systemic lupus erythematosus // Orphanet Journal of Rare Diseases. – 2006. – №1. – Р. 1-6.
2. Коваленко В.М., Шуба Н.М., Борткевич О.П., Білявська Ю.В. Системний червоний вовчак: патогенетичні особливості клінічної симптоматики, сучасна

- діагностична і терапевтична тактики ведення хворих // Український ревматологічний журнал – 2010 – Т.39, №1. – С. 13-23.
3. *Mwanda O.W.* Lupus anticoagulants: pathophysiology, clinical and laboratory association // *East African Medical Journal* – 2003. - Vol. 80. - № 11. – P.564 - 568.
  4. *Barcat D., Guirin V., Ryman A., Constans J., Vernhes J.P., Vergnes C., Bonnet F., Delbrel X., Morlat P., Longy-Boursier M., Conri C.* Thrombophilia and thrombosis in systemic lupus erythematosus: a case-control study // *Annals of Rheumatoid Disorders* – 2003 – Vol. 62. – P.1016-1017.
  5. *Paul R. J., Jose Alves, Akos F. Pap, Paolo Ramos, Munther A. Khamashta, Graham R. V. Huges* Fibrinogen in Systemic Lupus Erythematosus: More Than an Acute Phase Reactant? // *The Journal of Rheumatology*. – 2000. - Vol. 27. – P.1190-1195.
  6. *Barcat D., Guerin V., Ryman A., et al.* Thrombophilia and thrombosis in systemic lupus erythematosus: a case-control study // *Ann Rheum Dis* – 2003. – Vol. 62. - P.1016-1017.
  7. *Шевчук С.В., Савчук О.М.* Стан системи гемостазу у хворих на системний червоний вовчак Криворіжжя // *Буковинський медичний вісник* – 2005 – Т. 9. - № 2. – С. 265 - 267.
  8. *Ekdahl K.N., Rönnblom L., Sturfelt G., Nilsson B.* Increased phosphate content in complement component C3, fibrinogen, vitronectin, and other plasma proteins in systemic lupus erythematosus: covariation with platelet activation and possible association with thrombosis // *Arthritis Rheum.* – 1997. - Vol. 40 (12). – P.2178-186.
  9. *Козинец Г.И., Макаров В.А.* Исследование системы крови в клинической практике. М., 1997. – 220 с.
  10. *Huse K., Böhme H.J., Scholz G.H.* Purification of antibodies by affinity chromatography // *J. Biochem. Biophys. Methods*. - 2002. – Vol. 51, № 3. – P. 217-231.
  11. *Susan Hockfield, Carlson S., Evans C., Levitt P., Pintar J., Silberstein L.* Selected methods for antibody and nucleic acid probes // *J. Biochem. Biophys. Methods*. – 1993 – Vol. № 1. – P. 10-17.
  12. *Malvano R., Boniolo A., Dovis M., Zannino M.* Elisa for antibody measurement: Aspects related to data expression // *Journal of Immunological Methods*.-1981-Vol.48.-P. 51-60.
  13. *Платонова Т.Н., Сушко Е.А., Петров А.В., Соловьев Д.А.* // *Укр. биохим. журн.* – 1995.–Т. 67, № 4. – С. 75-80.
  14. *Шевчук С.В., Горницькая О.В., Чернышенко Т.М., Савчук А.Н., Платонова Т.Н.* Влияние антифосфолипидных антител на хронометрические коагуляционные тесты при системной красной волчанке // *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия медицинских наук.* – 2009. - № 2. – С. 32 – 35.
  15. *Yehuda Shoenfeld, Pier Luigi Meroni, Elias Toubi* Antiphospholipid Syndrome and Systemic Lupus Erythematosus: Are they Separate Entities or Just Clinical Presentations on the Same Scale? // *Curr. Opin. Rheumatol.* - 2009 – Vol. 21, N 5. – P. 495-500.
  16. *Rahman A.* Autoantibodies, lupus and the science of sabotage // *Rheumatology* – 2004. – Vol. 43, N11. – P. 1326-1336.
  17. *Волков Г.Л., Платонова Т.Н., Савчук А.Н., Горницькая О.В., Чернышенко Т.М., Краснобрижая Е.Н.* Современные представления о системе гемостазу // *К: Наукова думка.* – 2005. – 295 с.
  18. *Omar M Durrani, Caroline Gordon, Philip I Murray* Primary Anti-Phospholipid Antibody Syndrome (APS) Current Concepts // *Survey of Ophthalmology* – 2002 – Vol. 47. - P. 215-238.
  19. *Monica Galli, Davide Luciani, Guido Bertolini, and Tiziano Barbui* Anti-β2-glycoprotein I, antiprothrombin antibodies, and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome // *Blood* – 2003. - Vol. 102. - №. 8. - P. 2717-2723.

## АУТОИМУННЫЕ АНТИТЕЛА К КЛЮЧЕВЫМ КОМПОНЕНТАМ СИСТЕМЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ, КОТОРЫЕ ОБРАЗУЮТСЯ В КРОВОТОКЕ ПРИ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКЕ

**Вовк Т.Б., Савчук А.Н., Остапченко Л.И.**

Системная красная волчанка (СКВ) характеризуется нарушениями функционирования системы свертывания крови и часто сопровождается образованием тромбозов. Причиной этого могут выступать аутоантитела, которые образуются в процессе развития патологии. Данная статья посвящена получению и характеристике фракций аутоантител из крови больных СКВВ и исследованию их влияния на отдельные факторы системы гемостазу. В результате проведенных исследований было показано, что в присутствии аутоантител снижается скорость активации ключевых параметров свертывания – фактора X и протромбина. Полученные данные будут в дальнейшем использованы для более детальной характеристики участия аутоантител в патологических процессах свертывания крови, которые наблюдаются при заболевании СКВ.

**Ключевые слова:** аутоантитела, системная красная волчанка, система свертывания крови.

## CHARACTERISTIC OF AUTOIMMUNE ANTIBODIES TO COMPONENTS OF HEMOSTASIS, WHICH ARE PRODUCING IN BLOOD FLOW DURING SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

**Vovk T.B., Savchuk O.M., Ostapchenko L.I.**

Systemic lupus erythematosus (SLE) characterized by disruption of the functioning of blood clotting and is often accompanied by thrombosis. The reason for this could be autoantibodies that formed during disease. Presented paper is devoted to obtaining and characterization of autoantibodies fractions from blood of patients with SLE and investigation of their effect on factors of hemostasis. The research found that in the presence of autoantibodies speed of the activation of blood coagulation factor X and speed of prothrombin activation is decreasing. The data will be subsequently used for a more complete description of the involvement of autoantibodies in pathological processes of blood coagulation observed in SLE disease.

**Key words:** autoantibodies, systemic lupus erythematosus, coagulation system.