

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИТЕЛ К ГУАНОЗИНУ У БОЛЬНЫХ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ С ПРИЗНАКАМИ ПОРАЖЕНИЯ ПОЧЕК И НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

[Т.С. Макарова, И.Ю. Алехина, А.В. Александров](#)

ФГБУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии» РАМН (г. Волгоград)

Разработан высокочувствительный метод регистрации антител к гуанозину в сыворотке крови больных системной красной волчанки (СКВ). Модифицированный метод иммуноферментного определения антител к гуанозину доступен для широкого применения в клинических лабораториях. В сыворотке крови больных СКВ обнаружены антитела к гуанозину, их концентрация зависела от активности патологического процесса, наличия люпус-нефрита и поражения нервной системы. Выявление антител к гуанозину в предложенной модификации иммуноферментного анализа может быть использовано в качестве дополнительного теста в комплексной диагностике СКВ с целью уточнения степени активности патологического процесса и выделения клинических форм заболевания.

Ключевые слова: системная красная волчанка, гуанозин, антитела.

Макарова Татьяна Сергеевна — младший научный сотрудник ФГБУ НИИ КиЭР РАМН (г. Волгоград), рабочий телефон: 8 (8442) 78-90-98

Алехина Ирина Юрьевна — кандидат медицинских наук, докторант ФГБУ НИИ КиЭР РАМН (г. Волгоград), рабочий телефон: 8 (8442) 78-90-98

Александров Андрей Вячеславович — доктор медицинских наук, заведующий лабораторией функциональных методов исследования, ультразвуковой диагностики и восстановительной терапии ФГБУ НИИ КиЭР РАМН (г. Волгоград), рабочий телефон: 8 (8442) 78-90-98, e-mail: imlab@mail.ru

Введение. Пуриновые нуклеотиды и нуклеозиды присутствуют во всех без исключения живых клетках, выполняя при этом ряд ключевых функций. Нуклеозиды представляют собой большое семейство природных и химически модифицированных аналогов, характеризующихся огромным структурным разнообразием. Являясь фрагментом структуры нуклеотидов, многие нуклеозиды встречаются также и в свободном состоянии [2, 4]. Гуанозин — типичный пример промежуточного субстрата при метаболизме

пуринов, который осуществляет регуляторную функцию и обладает выраженной физиологической активностью (участвует в процессах белкового синтеза, регулирует взаимодействие гормонов с рецепторами и др.) [7].

У больных системной красной волчанкой (СКВ) иммунологическая картина характеризуется широким спектром аутоантител (Ат), включая антитела к ферментам и антитела к нуклеозидам ДНК (в первую очередь, Ат к гуанозину) [6].

Цель исследования: совершенствование диагностики клинических вариантов СКВ путем исследования процессов антителообразования к гуанозину.

Материалы и методы. Под наблюдением находилось 60 больных СКВ, проходивших стационарное лечение в ревматологическом отделении Городской клинической больницы № 25 г. Волгограда. Диагноз СКВ ставился на основании тщательного клинико-лабораторного обследования больных и верифицировался по модифицированным критериям американского общества ревматологов.

Средний возраст больных СКВ, вошедших в исследование, составил $36,32 \pm 15,27$ года, средний возраст лиц контрольной группы — $26,0 \pm 5,56$ года. Среди больных СКВ преобладали женщины (91,7%), абсолютное большинство составляли лица трудоспособного возраста (90%), вместе с тем 41 пациент (68,3%) имел ту или иную степень стойкой утраты трудоспособности. Deskриптивные статистики исходных клинических показателей больных СКВ представлены в табл. 1.

Таблица 1

Исходные показатели больных СКВ

Показатель	М	SD	95 % ДИ для М	Me
Продолжительность болезни (лет)	7,97	7,36	6,1...9,9	5,56
Возраст дебюта болезни (лет)	28,5	13,2	25,2...32,0	25,4
Активность: SLEDAI	8,9	5,7	7,5...10,4	8,07
Активность: ECLAM	5,3	2,8	4,6...6,0	5,03
Повреждение: SLICC/ACR DI	1,9	1,7	1,5...2,4	2,02
Качество жизни: ВАШ EQ-5D	46,7	17,0	42,7...51,1	45,1

Примечание: М — среднее значение, SD — стандартное отклонение, ДИ — доверительные интервалы, Me — медиана

Активность СКВ оценивалась с помощью индексов Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI) и European Consensus Lupus Activity Measure (ECLAM), а также по критериям, предложенных В. А. Насоновой (1985). Повреждение (необратимые изменения в состоянии здоровья) измерялось с помощью индекса Systemic Lupus International Collaborating Clinics / American College of Rheumatology (SLICC/ACR) Damage Index (DI). Для выделения вариантов течения СКВ применялись подходы, предложенные В. А. Насоновой, рассматривались «острое», «подострое» и «хроническое» течения заболевания. При оценке течения СКВ по критериям В. А. Насоновой были получены следующие результаты: у двух пациентов имело место острое течение СКВ, у 44-х — подострое, у 14-ти — хроническое.

Встречаемость основных клинических проявлений в исследуемой группе больных СКВ распределилась следующим образом: артралгии — 75%, малеоллярная эритема — 60%, протеинурия более 0,5 г/л — 55%, головные боли — 53%, дискоидные очаги — 52%,

поражение вегетативной нервной системы — 48 %, экссудативный перикардит — 35 %, артрит — 27 %, плеврит — 18 %, тромбоцитопения — 12 %; и была сопоставима с данными литературы [5].

Все находившиеся под наблюдением больные получали индивидуализированную комплексную терапию. Абсолютное большинство больных получали кортикостероиды, медиана дозы (в пересчете на преднизолон) составляла 20 мг/сут. Семь больных (12 %) получили «пульс-терапию» метилпреднизолоном (внутривенное введение в дозах от 250 до 1000 мг болюсно в течение 3–5 дней). Плазмаферез выполнялся у 15-ти (25 %) больных СКВ.

Антитела к гуанозину определяли в модифицированном ELISA-тесте с использованием антигенных наносистем, разработанных в НИИ клинической и экспериментальной ревматологии РАМН [1]. В качестве антигена использовался коммерческий препарат гуанозина (Guanosine; Product Number G6752, ≥ 98 %; Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA). Результаты учитывали на многоканальном микропланшетном спектрофотометре при длине волны 450 нм, полученные значения выражали в единицах оптической плотности (Ед). Наличие антител считалось положительным при превышении значений оптической плотности на 2 стандартных отклонения от средних значений контрольной группы.

Статистический анализ экспериментальных данных выполнялся с помощью программных пакетов STATISTICA (Statistica for Windows, Release 6.1, StatSoft Inc., USA) и SPSS (SPSS for Windows, Release 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Представление описательных статистик и выбор статистических критериев производились нами, исходя из цели исследования, решаемых при этом задач и рекомендаций руководств по биостатистике.

Результаты и обсуждение. Антитела к гуанозину были выявлены у 31-го (51,7 %) больного СКВ (иммуноферментным методом) и не были выявлены ни у одного обследованного в контрольной группе. Уровни антител к гуанозину положительно коррелировали с увеличением SLEDAI ($p = 0,007$) и ECLAM ($p = 0,025$), а также уровнем антител к нативной ДНК (анти-нДНК) ($p = 0,002$).

У больных с низкой активностью СКВ антитела к гуанозину выявлялись в 22,2 % случаев, в то время как у больных с умеренной активностью — у 41,2 %, а при высокой активности — у 88,2 % больных СКВ. Данное обстоятельство предполагает возможность использования показателей уровня антител к гуанозину в качестве дополнительного лабораторного маркера активности патологического процесса при СКВ (табл. 2).

Таблица 2

Содержание антител к гуанозину в зависимости от активности СКВ ($M \pm SD$)

Параметр	Доноры (n = 30)	Активность СКВ		
		Низкая (n = 9)	Умеренная (n = 34)	Высокая (n = 17)
Уровень антител к гуанозину (Ед)	0,0384 (0,017)	0,069 (0,028)	0,112 (0,063)	0,171 (0,095)

В многомерном анализе клинических проявлений антитела к гуанозину демонстрировали связь с поражением почек (люпус-нефрит) ($p < 0,001$), нервной системы ($p < 0,01$) и наличием выраженного цитопенического синдрома ($p = 0,033$) у больных СКВ.

Сравнение между собой групп больных СКВ, серопозитивных и серонегативных по антителам к гуанозину, продемонстрировало большую тяжесть поражения почек ($p = 0,004$), нервной системы ($p = 0,026$) и суставов ($p = 0,032$) у больных, имевших антитела к гуанозину.

Уровень антител к гуанозину прямо коррелировал с концентрацией креатинина плазмы (коэффициент ранговой корреляции Спирмена = 0,548; $p = 0,032$) и суточной протеинурией (коэффициент ранговой корреляции Спирмена = 0,467; $p = 0,044$), а также обратно коррелировал со скоростью клубочковой фильтрации (СКФ_p) (коэффициент ранговой корреляции Спирмена = -0,692; $p = 0,031$). Такое сочетание статистических зависимостей позволяло предполагать наличие ассоциации между повышением уровня антител к гуанозину и степенью активности люпус-нефрита. Кроме того, частота выявления антител к гуанозину у больных СКВ была достоверно выше при наличии поражения почек (табл. 3). Дополнительным аргументом в пользу участия в формировании люпус-нефрита являлась обнаруженная нами взаимосвязь антител к гуанозину с одним из важных факторов повреждения почек — антителами к нативной ДНК.

Таблица 3

Частота клинических проявлений СКВ с различным уровнем антител к гуанозину

Клинические проявления	Частота выявления, абсолютное количество (%)		Достоверность (χ^2 , p)
	Позитивные по антителам к гуанозину (n = 31)	Негативные по антителам к гуанозину (n = 29)	
Поражение нервной системы	19 (31,7)	10 (16,7)	$\chi^2 = 4,32$ $p = 0,048$
Поражение глаз	15 (25,0)	13 (21,7)	$p > 0,05$
Поражение сердца и сосудов	12 (20,0)	9 (15,0)	$p > 0,05$
Поражение почек	22 (36,6)	12 (20,0)	$\chi^2 = 5,34$ $p = 0,031$
Поражение дыхательной системы	8 (13,3)	3 (5,0)	$p > 0,05$
Поражение ЖКТ	9 (15,0)	8 (13,3)	$p > 0,05$
Артропатия	27 (45,0)	18 (30,0)	$\chi^2 = 5,01$ $p = 0,034$
Поражение кожи	17 (28,3)	19 (31,7)	$p > 0,05$

Примечание: при определении достоверности различий использовали χ^2 с поправкой Йетса (Yates corrected Chi-square)

Анализ частоты различных нейропсихических проявлений у больных СКВ, находившихся под нашим наблюдением, был проведен по рекомендациями Американской коллегии ревматологов 1999 года. Поражение нервной системы при СКВ характеризовалось более высоким уровнем антител к гуанозину и более частым выявлением данных Ат (табл. 3). Роль антител к гуанозину в поражении нервной системы может быть связана как с возможностью перекрестного реагирования данных антител с рецепторами нейронов, с изменением их функциональной активности (как это было ранее продемонстрировано для антител к ДНК и N-метил-D-аспартатных рецепторов), так и с фактом снижения под их влиянием роли вторичного мессенджера — циклического гуанозин-3',5'-монофосфата, участвующего в передаче сигналов в синапсах центральной нервной системы [3, 8].

Заклучение. Таким образом, у больных СКВ имеет место образование антител к гуанозину. Дальнейшее изучение роли Ат к гуанозину, являющихся, по-видимому, отдельной фракцией антител к ДНК, может обеспечить более полное понимание основных патогенетических механизмов развития СКВ. Вариант иммуноферментного анализа на основе иммобилизованного антигена-гуанозина может использоваться как для фундаментальных исследований, так и для решения прикладных задач в области медицины.

Список литературы

1. Гонтарь И. П. Эмульсионная полимеризация как метод, модифицирующий ферменты с сохранением биологических свойств их наноструктур / И. П. Гонтарь, Г. Ф. Сычева, А. В. Александров // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2010. — № 12. — С. 715–719.
2. Жеребцов Н. А. Биохимия / Н. А. Жеребцов, Т. Н. Попова, В. Г. Артюхов. — Воронеж : Изд-во ВГУ, 2002. — 696 с.
3. Крыжановский, Г. Н. Дизрегуляторная патология / Г. Н. Крыжановский — М. : Медицина, 2002. — 632 с.
4. Химия и биохимия аминокислот и полипептидов : методич. указания. — МГУП, Могилев. — 2003. — 43 с.
5. Bosma G. P. Association of global brain damage and clinical functioning in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus / G. P. Bosma [et al.] // Arthritis Rheum. — 2002. — Vol. 46, N 10. — P. 2665–72.
6. Colburn K. K. Circulating antibodies to guanosine in systemic lupus erythematosus: correlation with nephritis and polyserositis by acute and longitudinal analyses / K. K. Colburn // Lupus. — 2001. — Vol. 10, N 6. — P. 410–417.
7. Domek-Łopacińska K. Cyclic GMP metabolism and its role in brain physiology / K. Domek-Łopacińska, J. B. Strosznajder // J. Physiol. Pharmacol. — 2005. — N 56, Suppl. 2. — P. 15–34.
8. Kimura A. Antibodies in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus / A. Kimura [et al.] // Neurology. — 2010. — Apr 27, N 74 (17). — P. 1372–9.

IDENTIFICATION OF ANTIBODIES TO GUANOSINE AT PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS WITH SIGNS OF KIDNEYS DAMAGE AND NERVOUS SYSTEM

T.S. Makarova, I.Y. Alekhina, A.V. Aleksandrov

FSBE «Research institute of clinical and experimental rheumatology» RAMS (Volgograd c.)

The high-strung method of registration of antibodies to guanosine in blood serum of patients with systemic lupus erythematosus (SLE) is developed. The modified method of immunoenzymometric identification of antibodies to guanosine is accessible to wide application in clinical laboratories. Antibodies to guanosine are found out in blood serum of patients with SLE, their concentration depended on activity of pathological process, presence of lupus nephritis and nervous system damage. Revealing of antibodies to guanosine in the

offered modification of immunoenzymometric analysis can be used as additional test in complex diagnostics of SLE for the purpose of degree specification of activity of pathological process and education of clinical forms of disease.

Keywords: systemic lupus erythematosus, guanosine, antibodies.

About authors:

Makarova Tatyana Sergeevna — junior research assistant at FSBE «RI of CaER» RAMS (Volgograd), phone office number: 8(8442) 78-90-98

Alekhina Irina Yurevna — candidate of medical sciences, PhD student at FSBE «RI of CaER» RAMS (Volgograd), office phone: 8(8442) 78-90-98

Aleksandrov Andrey Vyacheslavovich — doctor of medical sciences, head of laboratory of functional methods of research, ultrasonic diagnostics and regenerative therapy at FSBE «RI of CaER» RAMS (Volgograd), office phone: 8(8442) 789098, e-mail: imlab@mail.ru

List of the Literature:

1. Gontar I. P. Emulsion polymerization as method modifying enzymes with conservation of their biological properties nanostuctures / I. P. Gontar, G. F. Sychev, A. V. Aleksandrov // *Bulletin of experimental biology and medicine*. — 2010. — № 12. — P. 715–719.
2. Zherebtsov N. A. *Biochemistry* / N. A. Zherebtsov, T. N. Popova, V. G. Artyukhov. — Voronezh: PH VSU, 2002. — 696 P.
3. Kryzhanovsky, G. N *Disregulatory pathology* / G. N. Kryzhanovsky — M: Medicine, 2002. — 632 P. *Chemistry and biochemistry of amino acids and polypeptides: methodical guidance*. — MSUP, Mogilev. — 2003. — 43 P.
4. *Chemistry and biochemistry of amino acids and polypeptides: practical instructions*. — MSPU, Mogilev. — 2003. — 43 p.
5. Bosma G. P. Association of global brain damage and clinical functioning in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus / G. P. Bosma [et al.] // *Arthritis Rheum*. — 2002. — Vol. 46, N 10. — P. 2665–72.
6. Colburn K. K. Circulating antibodies to guanosine in systemic lupus erythematosus: correlation with nephritis and polyserositis by acute and longitudinal analyses / K. K. Colburn // *Lupus*. — 2001. — Vol. 10, N 6. — P. 410–417.
7. Domek-Łopacińska K. Cyclic GMP metabolism and its role in brain physiology / K. Domek-Łopacińska, J. B. Strosznajder // *J. Physiol. Pharmacol*. — 2005. — N 56, Suppl. 2. — P. 15–34.
8. Kimura A. Antibodies in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus / A. Kimura [et al.] // *Neurology*. — 2010. — Apr 27, N 74 (17). — P. 1372–9.