

УДК 616.72-002

## ДНКАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ И СЫВОРОТОК КРОВИ У БОЛЬНЫХ ПСОРИАТИЧЕСКИМ АРТРИТОМ

Е.В. Кундер, ассистент, к.м.н.

Кафедра госпитальной терапии

УО «Витебский государственный медицинский университет»

*В данной работе приводятся результаты обследования пациентов с псориатическим артритом на наличие сывороточной и абзимной ДНКАзной активности. Установлено статистически высокодостоверное различие между уровнями ДНКАзной активности сывороток и препаратов поликлональных иммуноглобулинов, выделенных из сыворотки крови у больных по сравнению с величинами аналогичной активности у здоровых лиц.*

*Выявлены корреляционные зависимости между ДНКАзной активностью сыворотки крови и антител с клиническими проявлениями (непрерывно рецидивирующим течением псориаза, рентгенологической стадией артрита) и лабораторными критериями, что доказывает патогенетическое значение ДНКАзных абзимов при псориатическом артрите.*

*Наблюдаемая нами корреляция между ДНКАзной активностью антител и сывороток крови позволяет использовать с диагностической целью метод определения сывороточной ДНКАзной активности как наименее трудоемкий и более дешевый по сравнению с определением абзимной активности.*

**Ключевые слова:** псориатический артрит, ДНКАзная активность, сыворотка крови, поликлональные иммуноглобулины.

*The serum and abzyme DNase catalytic activity was assessed in patients with psoriatic arthritis and in healthy donors. The levels of DNase activity of sera and polyclonal IgG were significantly higher in psoriatic arthritis patients in comparison with healthy controls. The correlation between serum and abzyme catalytic activity with some clinical (constantly recurrent course, radiologic stage of arthritis) and laboratory findings were revealed. This fact supports the role of catalytic antibodies in pathogenesis of psoriatic arthritis. The observed correlation between serum and abzyme DNase activity makes it possible to use the serum DNase assessment as additional diagnostic criterium for psoriatic arthritis. This technique is cheap and less time-consuming than direct abzyme assessment.*

**Key words:** psoriatic arthritis, DNase activity, serum, polyclonal IgG

### Введение

Псориатический артрит представляет собой заболевание из группы серонегативных спондилоартритов, ассоциированное с псориазом и характеризующееся развитием прогрессирующего аутоиммунного воспалительного процесса с поражением опорно-двигательного аппарата и разнообразными системными проявлениями. Согласно современным представлениям псориатический артрит рассматривается как аутоиммунное заболевание, при котором происходят изменения клеточного гуморального иммунитета [20]. Клеточные механизмы иммунопатологии касаются в первую очередь Т-лимфоцитов, которые являются наиболее частыми клетками воспаления при данном заболевании [17, 19]. Большое количество работ по изучению патофизиологии псориатического артрита посвящено исследованию иммунных комплексов и разнообразных аутоантител. Проведены исследования физико-химических свойств иммунных комплексов, содержания в них различных иммуноглобулинов, что определяет их размер, патогенность, способность активировать комплемент и скорость элиминации из организма [5]. Что касается аутоантител, то при псориатическом артрите выявлены антинуклеарные антитела (14%), антитела к двухспираль-

ной ДНК (3%), антитела к РНП (1%) [13], антиперинуклеарные антитела [11].

При псориатическом артрите предпринимаются попытки поиска специфичных для данного заболевания иммунологических маркеров. При данном заболевании изучается уровень антител к циклическим цитруллинированным пептидам (анти-ЦЦП). Исследователями [9, 10] был сделан вывод о том, что уровень определяемых анти-ЦЦП антител позволяет разграничить такие ревматоидный и псориатический артрит, что особенно актуально в связи с гетерогенностью клинического течения псориатического артрита, а также развитием в ряде случаев тяжелого деструктивного артрита с прогрессирующим течением заболевания. Однако определение данных антител, высоко специфичных для ревматоидного артрита, может использоваться, скорее, для дифференциальной диагностики псориатического артрита.

Таким образом, спектр аутоантител, определяемых при псориатическом артрите, чрезвычайно разнообразен. Однако среди них до настоящего времени нельзя назвать те, которые были бы специфичны и могли бы стать определяющими иммунологическими маркерами данного заболевания.

В связи с вышесказанным, перспективными

следует признать исследования, направленные на исследование при псориатическом артрите новых, ранее не изученных иммунологических феноменов. В этой связи большой интерес представляет дальнейшее уточнение роли иммуноглобулинов и антител в патогенезе данного заболевания, изучение их новых свойств, в частности, ферментативной (абзимной) активности.

Проведенные нами [3], группой профессора Г.А. Невинского из Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН [6], а также другие исследования [14], продемонстрировали, что в крови здоровых лиц каталитически активные антитела (абзимы), расщепляющие белки, нуклеиновые кислоты, нуклеотиды или не выявляются, или их уровень является низким. В то же время, в крови пациентов с рядом аутоиммунных заболеваний антитела с указанными выше активностями обычно имеют высокую удельную активность. Согласно имеющимся предварительным результатам, появление абзимов в крови людей является ранним признаком развития аутоиммунной патологии. Эту гипотезу доказывает факт выявления наибольших уровней абзимной (ДНКазной, протеолитической) активности у больных системной красной волчанкой, ревматоидным артритом, аутоиммунным тиреоидитом, демиелинизирующими заболеваниями нервной системы. В работах Института ревматологии РАМН в 2005 году определение ДНКазной абзимной активности признано одним из наиболее перспективных диагностических критериев при ревматоидном артрите и СКВ [7].

Таким образом, исследования, посвященные изучению абзимной активности при различных клинических формах псориатической болезни, являются актуальными и перспективными. Следует, однако, учитывать, что современные комбинированные методы очистки иммуноглобулинов из сывороток крови являются достаточно сложными, длительными и трудоемкими в исполнении. При этом очевидно, что на каждом этапе очистки могут происходить конформационные изменения молекул антител, изменяющие (как правило, снижающие) исходный уровень каталитической активности. Изучение взаимосвязей между сывороточной и абзимной каталитической активностью, в том числе и в наших предшествующих работах [4], создает предпосылки для разработки новых методов лабораторной диагностики аутоиммунных заболеваний, позволяет уточнить возможное участие абзимов в их патогенезе. Полученные предварительные результаты в этом направлении дают основания для дальнейших исследований, в том числе и с целью разработки новых методов диагностики и дифференциальной диагностики псориатического артрита, а также, возможно, выработки критериев контроля эффективности проводимых лечебных мероприятий.

Целью данного исследования явилось изучение

взаимосвязи между нуклеазной (ДНКазной) активностью сывороток крови и иммуноглобулинов у больных псориатическим артритом.

### Материалы и методы

Диагноз псориатического артрита выставлялся согласно критериям Mathies [16], а также согласно диагностическим критериям и критериям исключения псориатического артрита Института ревматологии РАМН [1].

Обследован 31 пациент с псориатическим артритом, из них мужчин 12 (39%), женщин – 19 (61%). Средний возраст больных составил  $46,32 \pm 2,2$  лет, средний возраст пациентов – мужчин равнялся  $43,66 \pm 3,52$  года, женщин –  $48 \pm 2,84$  лет. На наличие псориаза у родственников указали 13 человек (42%). Средняя длительность существования кожного псориаза у обследованных пациентов составила  $17,4 \pm 1,75$  лет. Распространенный характер кожного псориаза имели 12 больных (39%), ограниченный – 14 (45%). У 5 пациентов (16%) констатирована ремиссия кожного псориаза. У 11 (35%) пациентов диагностирован обыкновенный (вульгарный) псориаз, у 8 (26%) – обыкновенный и интертригинозный, у 6 (19%) – эритродермический и у одного больного (3%) выявлен экссудативный псориаз. Стационарную стадию псориаза демонстрировали 22 больных (71%), регрессирующую – 4 (13%). Непрерывно рецидивирующее течение псориаза диагностировано в 22 случаях (71%), торпидное – в 4 (13%). Псориатическая ониходистрофия выявлена у 19 пациентов (61%). Средняя длительность поражения ногтей равнялась  $5,2 \pm 0,98$  года. Средняя длительность суставного синдрома в данной группе больных составила  $7,88 \pm 1,13$  лет. У 26 пациентов (84%) кожный псориаз предшествовал суставному синдрому, в 3 случаях (10%) кожный и суставной синдром развились одновременно, а у 2 больных (6%) кожный псориаз появился после реализации суставного синдрома. Псориатический полиартрит выявлен у 25 пациентов (81%), олигоартрит – у 6 (19%), дактилит – у 16 (51%), сакроилеит – у 10 (32%), спондилит – у 24 (77%). При обследовании активность воспалительного процесса 1 степени определена в 9 случаях (29%), 2 степени – в 16 (52%), 3 степени – в 6 (19%). Рентгенологическая 1 стадия артрита на момент осмотра выявлена у 3 больных (10%), 2 стадия – у 15 (48%), 3 стадия – у 9 (29%), 4 стадия – у 4 пациентов (13%). 18 больных (58%) имели 1 степень недостаточности функции опорно-двигательного аппарата, 13 человек (42%) – 2 степень.

Длительность лечения кожного псориаза в обследованной группе больных составила  $13,6 \pm 1,56$  лет. Длительность лечения суставного синдрома равнялась  $5,8 \pm 0,8$  лет. Длительность лечения нестероидными противовоспалительными препаратами составила  $6,8 \pm 0,74$  лет. Средняя длительность лечения базисными средствами составила у на-

ших пациентов  $2,93 \pm 0,58$  года. В стационаре метотрексат в суточной дозе 7,5-12,5 мг был назначен 29 пациентам, одному пациенту назначалась комбинированная базисная терапия сульфасалазином (1,5 г) и метотрексатом (7,5 мг), одному больному был назначен сульфасалазин.

Контрольной группой послужили 39 доноров Витебской областной станции переливания крови, из которых мужчин было 23 (59%), женщин – 16 (41%). Средний возраст доноров составил  $37 \pm 1,38$  лет, мужчин –  $36,4 \pm 1,88$  лет, женщин –  $38,6 \pm 1,86$  лет.

Для достижения поставленных задач использовались сыворотки крови больных и здоровых лиц, а также препараты поликлональных IgG 1, 2 и 4 подкласса, выделенные из сыворотки крови больных и доноров комбинированным риванол-аффиннохроматографическим методом [2]. Концентрацию белка в препарате определяли спектрофотометрически на длине волны 280 нм. Препараты иммуноглобулинов, выделенные из сывороток больных и здоровых лиц, оказались гомогенными по результатам диссоциирующего электрофореза в полиакриламидном геле в системе буферов по Laemmli с использованием 10% или 12% разделяющего геля в присутствии додецилсульфата натрия по методам, изложенным в [2].

#### **Определение ДНКазной активности сывороток крови**

Постановку реакции проводили в центрифужных пробирках. К 0,1 мл разведенной 1/5 сыворотки прибавляли 0,2 мл стандартизованного раствора ДНК в концентрации 300 мкг/мл и 0,1 мл трис HCl буфера, содержащего 0,01М MgCl<sub>2</sub>, рН 8,3. В контроле вместо сыворотки использовали физиологический раствор. Пробы инкубировали при 37°C в течение 2 часов. После инкубации к пробам прибавляли по 20 мкл 0,75% риванола. Результат оценивали полуколичественно по величине сгустка нераспавшейся ДНК в баллах.

Отсутствие активности (сгусток ДНК) принимали за 0 баллов, минимальная активность (рыхлый сгусток) – 1 балл, умеренная активность (рыхлый сгусток, хлопья, нити ДНК) – 2 балла, высокая активность (хлопья, нити) – 3 балла, очень высокая активность (хлопья, нити, распад сгустка) – 4 балла и распад сгустка ДНК – 5 баллов.

#### **Определение ДНКазной активности иммуноглобулинов**

Постановка реакции осуществлялась согласно методике, разработанной нами и апробированной на различных биологических моделях [2]. В состав реакционной смеси входили ИГ в концентрации 1 мг/мл в 0,1 мл пробы, 0,1мл 0,02М трис- HCl буферного раствора рН 7,4, содержащего 0,01М раствор хлорида магния и 0,2 мл раствора ДНК в концентрации 300 мкг/мл. Реакция ставилась в дублях. Затем осуществлялась инкубация при 37°C

в течение 20 часов. Учет результатов реакции проводился аналогично вышеописанному.

Для обработки результатов использовались параметрические (Стьюдента) в случае нормального распределения и непараметрические (Манна-Уитни) критерии статистики.

#### **Результаты исследования**

Результаты определения уровней ДНКазной активности сывороток и иммуноглобулинов (абзимов) у больных псориатическим артритом представлены в таблице.

*Таблица.* Уровни ДНКазной активности сывороток крови и иммуноглобулинов (абзимов) у больных псориатическим артритом

Обследованные лица	ДНКазная активность сывороток, баллы	ДНКазная активность иммуноглобулинов, баллы
Пациенты с псориатическим артритом	$3,81 \pm 0,176$ ; n=31	$3,3 \pm 0,187$ ; n=31
Здоровые лица	$1,58 \pm 0,134$ ; n=36	$0,19 \pm 0,0725$ ; n=39
Статистическая достоверность различий	p<0,001	p<0,001

При проведении корреляционного анализа между величинами сывороточной и абзимной ДНКазной активности среди обследованных больных обнаружена достоверная зависимость ( $r=0,714$ ;  $p<0,001$ ;  $n=28$ ). При дальнейшем анализе в группе больных оказалось, что ДНКазная абзимная и сывороточная активности коррелировали с непрерывно рецидивирующим течением псориаза ( $0,5$ ;  $p<0,05$ ;  $n=28$ ) и ( $0,54$ ;  $p<0,05$ ;  $n=31$ ) соответственно. ДНКазная активность иммуноглобулинов обратно коррелировала с рентгенологической стадией артрита ( $-0,36$ ;  $p=0,05$ ;  $n=28$ ). Сывороточная и абзимная ДНКазная активности коррелировали с некоторыми показателями иммунограммы, в частности, с количеством Т-активных лимфоцитов ( $0,754$ ;  $p<0,05$ ;  $n=12$ ) и ( $0,62$ ;  $p<0,05$ ;  $n=15$ ), соответственно.

#### **Обсуждение**

Таким образом, проведенная оценка абзимной ДНКазной активности обнаружила достоверные различия между группой больных псориатическим артритом и здоровыми лицами. Наличие значительных уровней ДНКазной активности антител подтверждает представление о псориатическом артрите как о прогрессирующем системном аутоиммунном заболевании, при котором наблюдаются выраженные иммунопатологические сдвиги. 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, а также должно стать поводом для обследования больного на наличие бессимптомной артропатии. Корреляция ДНКазной активности антител с количеством Т-активных лимфоцитов сви-

детельствует об участии абзимов в иммунопатологических процессах при псориатическом артрите. Обладающие ДНКазной активностью иммуноглобулины при данном заболевании могут оказывать непосредственное повреждающее воздействие на ткани, реализуя свои цитотоксические эффекты. Кроме того, фрагменты антител могут достигать ядра клетки и, связываясь с нуклеопротеидами, непосредственно влиять на внутриклеточный метаболизм [8]. Также каталитические антитела могут регулировать клеточное развитие, участвуя в процессах апоптоза [12], значительные нарушения которого при псориазе являются причиной гиперпролиферации эпидермиса.

При проведении корреляционного анализа между величинами абзимной и сывороточной ДНКазной активности выявлена прямая взаимосвязь между этими показателями. Однако уровень сывороточной активности как у больных, так и у здоровых лиц оказывается существенно выше абзимной. Это объясняется наличием в сыворотке крови собственной ДНКазной активности I и II типа, которая появляется в сыворотке крови из органов и тканей при различных патологических состояниях. Оба этих фермента расщепляют нуклеосомную ДНК, ускоряя утилизацию циркулирующего ядерного материала. ДНКаза I типа представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 30,400 Da и является катион-связывающей секреторной эндонуклеазой, расщепляющей двухспиральную ДНК по специфическим последовательностям нуклеотидов [18]. ДНКаза II типа – это гликопротеин с молекулярной массой 45 kDa, является эндонуклеазой с кислым оптимумом pH и не требует бивалентных катионов. Она присутствует в лизосомах, ядре и некоторых секретах [15].

Согласно полученным нами данным, можно заключить, что значимую долю суммарной сывороточной ДНКазной активности составляет активность каталитических антител. Этот факт подтверждает патогенетическое значение абзимов при псориатическом артрите.

### Выводы

1. У больных псориатическим артритом выявляются сывороточная и абзимная ДНКазная активности, уровни которых достоверно превышают аналогичные показатели у здоровых лиц.

2. ДНКазная активность иммуноглобулинов коррелирует с клиническими признаками заболевания (непрерывно рецидивирующим течением псориаза, рентгенологической стадией артрита), а также лабораторными показателями (количеством Т-активных лимфоцитов), доказывая патогенетическую роль абзимных антител при псориатическом артрите.

3. Существует прямая корреляционная зависимость между величинами сывороточной и абзимной ДНКазной активности.

4. Определение сывороточной ДНКазной активности может стать новым методом иммунологической диагностики и дифференциальной диагностики псориатического артрита.

### Литература

- Агабабова, Э.Р. Разработка и апробация диагностических критериев псориатического артрита / Э.Р. Агабабова, В.В. Бадочкин, Ш. Эрдес // Тер. архив. – 1989. – №12. – С.117-121.
- Генералов, И.И. Абзимная активность иммуноглобулинов / И.И. Генералов. – Витебск, 2000. – 167с.
- Генералов, И.И. Поликлональные каталитические антитела и их возможное биологическое значение / И.И. Генералов, Д.К. Новиков // Успехи современной биологии. – 1998. – №118. – С. 178-193.
- Генералов, И.И. Каталитическая активность сывороток и иммуноглобулинов при аутоиммунных заболеваниях / И.И. Генералов, Т.В. Сапего, Е. В. Кундер // Вестник ВГМУ. – 2005. – том 4, №1. – С. 20-24.
- Милевская, С.Г. Характеристика иммунных комплексов у больных псориазом / С.Г. Милевская, Г.В. Потапова // Вестник дерматологии и венерологии. – 1998. – № 5. – С. 35-37.
- Невинский, Г.А. Природные каталитически активные антитела (абзимы) в норме и при патологии / Г.А. Невинский, Т.Г. Канышкова, В.Н. Бунева // Биохимия. – 2000. – №65. – С. 1478-1487.
- Хитров, А.Н. ДНК-абзимы при ревматоидном артрите: патогенетическая и клиническая значимость / А.Н. Хитров, Н.Б. Ромаданова, Е.А. Огнева // Тер. архив. – 2005. – №11. – С. 75-80.
- Чурилов, Л.П. // Иммунологическая регуляция клеточных функций: Сб. науч. тр./под ред. Зайчика А.Ш. – Ленингр. педиатр. мед. ин-т. – Л., 1988. – 134 с.
- Alenius, G.M. Antibodies against cyclic citrullinated peptide (CCP) in psoriatic patients with or without manifestation of joint inflammation / G.M. Alenius, E. Berglin, S. Rantapaa Dahlqvist // Ann. Rheum. Dis. – 2005. - Vol. 32. – P. 1136-1139.
- Anti-citrullinated peptide antibodies may occur in patients with psoriatic arthritis / B. Vander Cruyssen B. [et al.] // Ann. Rheum. Dis. – 2005. – Vol.64. – P. 1145 – 1149.
- Calzavara-Pinton, P.G. Incidence of antiperinuclear factor in patients with psoriatic arthritis / P.G. Calzavara-Pinton, F. Franceschini, C. Manera // Adv. Exp. Med. Biol. – 1999. – Vol. 455. – P. 215-220.
- Catalytic antibodies from human serum with RNase activity. New tools for investigation of RNA structure / A. Vlassov [et al.] // Nucleic Acid Research. – 1998. – Vol.26. – P. 5243-5250.
- Johnson, S.R. Autoantibodies in biological agents naive patients with psoriatic arthritis / S.R. Johnson, C.T. Schentag, D.D. Gladman // Rheum. Dis. – 2005. – Vol. 64, №5. – P. 770-772.
- Kalaga, R. Unexpected presence of polyreactive catalytic antibodies in IgG from immunized donors and decreased levels in rheumatoid arthritis / R. Kalaga, L. Li // J. Immunol. – 1995. – Vol.155, №5. – P. 2695-2702.
- MacLea, K.S. Revised structure of the active form of human deoxyribonuclease II alpha / K.S. MacLea, R.J. Krieser, A. Eastman // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2002. – Vol. 292. – P. 415-421.
- Mathies, H. Psoriatic arthritis / H. Mathies // Acta Med. Austriaca. – 1974. – Vol.1. – P. 3-12.
- Reduced synovial membrane ELAM-1 expression, macrophage numbers and lining layer hyperplasia in psoriatic arthritis as compared with rheumatoid arthritis / D. Veale [et al.] // Arthritis Rheum. – 1993. – Vol. 36. – P.893-900.
- Suck, D. Structure of DNase I and II. A resolution suggests a mechanism for binding to and cutting DNA / D. Suck, C. Oeffren // Nature. – 1986. – Vol. 321. – P. 446-453.
- Veale, D.J. Immunohistochemical markers for arthritis in psoriasis / D.J. Veale, L. Barnes, S. Rogers // Ann. Rheum. Dis. – 1994. – Vol.53. – P. 450-454.
- Veale, D.J. Immunopathology of psoriatic arthritis / D.J. Veale, C. Ritchlin, O. FitzGerald // Ann. Rheum. Dis. – 2005. – Vol.64. – P. 2126-2129.

Поступила 26.09.06