

Клинико-диагностическое значение определения антител к эластину и эластазе в сыворотке крови больных ревматоидным артритом, системной красной волчанкой, системной склеродермией

И.П. Гонтарь, Н.В. Ненашева, Н.А. Матасова, Э.Р. Аветисова, Л.И. Кочнева, И.А. Зборовская
НИИ клинической и экспериментальной ревматологии РАМН, Волгоград,

Целью исследования явилось изучение корреляции между уровнями антител к эластину и эластазе в сыворотке крови больных ревматоидным артритом (РА), системной красной волчанкой, системной склеродермией и особенностями течения этих заболеваний методом непрямого иммуноферментного анализа с использованием иммобилизованных магнитосорбентов. С увеличением активности ревматоидного артрита, присоединением висцеритов наблюдалось увеличение продукции антител к эластазе и эластину. При системной красной волчанке с увеличением степени активности отмечена тенденция к нарастанию уровня антител к эластазе и эластину. У больных системной склеродермией при I и II степени активности возможно изолированное повышение антител к тому или другому антигену, тогда как III степень ассоциируется с увеличением в сыворотке крови больных антител и к эластазе, и к эластину. Исследование уровня данных антител в сыворотке крови больных ревматическими заболеваниями иммуноферментным методом с использованием иммобилизованной формы магнитоуправляемого сорбента позволит улучшить диагностику этих нозологий, а также расширить знания о патогенезе аутоиммунной патологии.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, системная красная волчанка, антитела к эластину и эластазе.

The aim of the present work was to study a correlation between the level of antibodies to elastin and elastase in blood serum of patients with rheumatoid arthritis (RA), systemic lupus erythematosus and systemic scleroderma as well as to find out peculiarities in the course of these diseases using the techniques of indirect immuno-enzymatic analysis with immobilized magnet sorbates. With increased RA activity and viscerites one can see an increased production of antibodies to elastase and elastin. In systemic lupus erythematosus such an increased activity shows a tendency to increasing the levels of antibodies to elastin and elastase. In systemic scleroderma the 1st and 2nd stages of activity may be accompanied both by isolated increase of antibodies to this or that antigen while the 3rd stage is associated with the increase of antibodies to elastin and elastase in patient's blood serum.

Studying these antibodies level in blood serum of patients with rheumatoid diseases using an immuno-enzymatic analysis with immobilized forms of magnetically operated sorbates will improve diagnostics of these nosologies and will deepen our knowledge on autoimmune pathology.

Key words: rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, antibodies to elastin and elastase

Эластин является основным белковым компонентом, из которого состоят эластические волокна. Эти волокна распространены преимущественно в органах и тканях, функция которых связана с большими деформациями под действием малых нагрузок с полным (эластическим) восстановлением формы после прекращения воздействия [1].

В деградации эластина принимают участие эластазы. Эластазы – пептид-гидролазы (КФ 3.4.21...), отличающиеся способностью гидролитически расщеплять молекулу эластина, мало поддающегося действию других протеиназ [6]. Чрезмерная активность этих ферментов может играть важную роль при некоторых заболеваниях. Установлено, что в очагах воспаления из лизосомных гранул гранулоцитов выделяются эластаза и нейтрофильная протеиназа. При генетически обусловленном дефиците α_1 -антитрипсина распад коллагена в очаге воспаления под действием эластазы нарушается. При отсутствии ингибитора протеиназ нейтральная протеиназа и эластаза (вызывающая локальный распад коллагена) могут работать неупорядоченным образом. Наследственный дефект может заключаться в медленном высвобождении протеиназного ингибитора из места его синтеза в клетках печени. Эластаза гранулоцитов и макрофагов играет важную роль в деструкции соединительной ткани при ожогах и в патогенезе заболеваний, связанных с разру-

шением эластических структур (атеросклероз, эмфизема легких).

Антитела (АТ) к эластину имеются в сыворотке крови у всех людей, однако их уровень определяется состоянием здоровья [3]. Следствием гуморального иммунного ответа на пептиды эластина может стать повреждение ткани с последующей деградацией эластических волокон [4]. Так, на ограниченном количестве больных без всестороннего клинического анализа было установлено повышение уровня АТ к данному белку у больных системной красной волчанкой (СКВ) [5], системной склеродермией (ССД) [3], ревматоидным артритом (РА) [4]. Изучению антител к эластазе посвящены единичные работы без исследования корреляционных связей с уровнем АТ к эластину.

Целью исследования стало изучение корреляции между уровнями АТ к эластину и эластазе в сыворотке крови больных РА, СКВ, ССД и особенностями течения этих заболеваний.

Нами были поставлены следующие задачи:

1. Получить иммобилизованную форму антигена с магнитными свойствами на основе эластина и эластазы.
2. Отработать условия и технику постановки иммуноферментного анализа с использованием иммобилизованных антигенных форм.

3. Исследовать зависимость уровня специфических АТ к эластазе и эластину от активности заболевания, поражений внутренних органов у больных РА, СКВ и ССД.

Материалы и методы

АТ к эластину и эластазе определяли в сыворотке крови больных методом непрямого иммуноферментного анализа (ELISA-тест) с использованием иммобилизованных магнитосорбентов [1]. Магнитосорбенты представляли собой полиакриламидные гранулы размером от 10 до 100 мкм, содержащие магнитный материал и эластин и эластазу в качестве антигена. Иммобилизацию проводили методом эмульсионной полимеризации в потоке газообразного азота. В качестве антигена при определении АТ к эластазе использовали коммерческий препарат эластазы панкреатической из поджелудочной железы свиньи с активностью 4 ЕД/мл (компании SIGMA-ALDRICH, США), при определении АТ к эластину – коммерческий препарат эластина из легких человека (компании SIGMA-ALDRICH, США). Результаты иммуноферментного определения АТ к эластазе и эластину выражали в единицах оптической плотности (ед.опт.пл.). Положительными считались результаты, превышающие на два стандартных отклонения показатели, полученные при обследовании здоровых лиц. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программных пакетов «Statistica 6.0», «Excel 5.0», «SPSS 10.0».

Под наблюдением находились 30 практически здоровых лиц – доноров станции переливания крови МУЗ ГКБ № 25 в возрасте от 26 до 60 лет, среди которых 18 женщин и 12 мужчин, а также 106 больных с достоверным диагнозом РА, поставленным на основании критериев Американской коллегии ревматологов (ACR, 1987), 35 больных с достоверным диагнозом СКВ, поставленным на основании критериев АРА (1982), рабочей классификации клинических вариантов течения СКВ (В.А. Насонова, 1972–1986), классификаций SLAM, SLEDAI, SLICC-ACR, 28 больных с достоверным диагнозом ССД, поставленным на основании критериев АРА (1980) и отечественной классификации болезни (Н.Г. Гусева, 1975, с доп. 1993).

Больные РА. Среди больных РА были 85 (80,2%) женщин и 21 (19,8%) мужчина. Средний возраст больных РА составил $53,40 \pm 12,67$ года. В соответствии с диагностическими критериями I степень (минимальная) активности ревматоидного процесса определена у 10 (9,4%),

II (умеренная) – у 68 (64,2%) и III (максимальная) – у 32 (26,4%) больных. По модифицированным критериям Штейнброекера установлены следующие стадии поражения суставов: I стадия – у 5 (4,7%), II – у 56 (52,3%), III – у 31 (29,2%) и IV – у 14 (13,8%) больных. По степени функциональной недостаточности суставов распределение больных было следующим: 0 – не наблюдалось, I-я – у 2 (1,9%), 2-я – у 85 (80,2%), 3-я – у 19 (17,9%) больных. Средняя продолжительность заболевания $15,3 \pm 5,9$ года. Клинико-инструментальное, иммунологическое и биохимическое обследование больных позволило выявить у 48 (45,3%) больных РА системные проявления заболевания. Наиболее часто отмечалось поражение центральной нервной системы (церебральный васкулит) – у 30 (62,5%), анемия имела у 15 (14,2%). У большинства больных (98 человек, 92,5%) выявлен полиартрит.

Больные СКВ. Среди обследованных больных СКВ было 5 (14,3%) мужчин и 30 (85,7%) женщин в возрасте от 19 до 55 лет. Активность процесса в исследуемой группе больных определялась в соответствии с клиническими и лабораторными критериями по В.А.Насоновой, при этом у 4 (11,4%) человек была I степень активности патологического процесса, у 24 (68,6%) больных – II, у 7 (20%) человек – III степень. У 7 (20%) больных имело место острое течение СКВ, у 26 (74,3%) человек – подострое, у 2 (5,7%) человек – хроническое.

Больные ССД. Среди больных ССД было 25 (89,3%) женщин и 3 (10,7%) мужчины. Средний возраст больных составил $25,4 \pm 4,6$ года, средняя продолжительность болезни – $12,0 \pm 3,6$ года. У 19 (67,9%) из наблюдавшихся больных имела лимитированная форма болезни, у 9 (32,1%) – диффузная. I степень активности установлена у 3 (10,7%), II – у 21 (75%), III – у 4 (14,7%) больных. Хроническое течение выявлено у 12 (42,9%) пациентов, подострое – у 13 (46,4%), острое – у 3 (10,7%). I стадия заболевания (начальная) диагностирована у 6 (21,4%) больных, II (генерализованная) – у 18 (64,3%), III (терминальная) – у 4 (14,3%) больных.

Результаты и обсуждение

Средняя величина оптической плотности при определении АТ к эластазе у доноров составила 0,095 ед.опт.пл., а верхняя граница этих значений равна 0,112 ед.опт.пл. Средняя величина оптической плотности для АТ к эластину в группе здоровых лиц составила $0,130 \pm 0,050$ ед.опт.пл. Показатели, превышающие эти значения на величину двух стандартных отклонений, были приняты

Таблица 1

Уровень АТ эластазе и эластину в сыворотке крови здоровых лиц и больных РА в зависимости от активности процесса

Контингент	Число наблюдений	Статистические показатели	АТ к эластазе, ед.опт.пл.	АТ к эластину, ед.опт.пл.
Здоровые	30	$M \pm m$ σ	$0,095 \pm 0,002$ 0,009	$0,130 \pm 0,005$ 0,025
Больные с I степенью активности	6	$M \pm m$ σ	$0,120 \pm 0,007^{**}$ 0,022	$0,200 \pm 0,01^{**}$ 0,031
Больные со II степенью активности	68	$M \pm m$ σ	$0,232 \pm 0,004^*$ 0,030	$0,258 \pm 0,003^*$ 0,027
Больные с III степенью активности	32	$M \pm m$ σ	$0,361 \pm 0,003^*$ 0,018	$0,297 \pm 0,003^{**}$ 0,019

* $p < 0,01$, ** $p < 0,05$.

за верхнюю границу нормы – 0,180 ед.опт.пл. В дальнейшем все величины оптической плотности, превосходящие верхнее значение, считались повышенными.

Больные РА. Изменение уровня АТ к эластазе наблюдалось у 59 (55,7%), а к эластину – у 25 (23,6%) больных РА. В группе больных с I степенью активности РА отмечалась тенденция к увеличению уровня АТ к эластазе и эластину ($p < 0,05$) по сравнению с аналогичным показателем у здоровых лиц. У больных со II степенью активности РА наблюдалось увеличение содержания АТ к эластину и эластазе в 1,5 раза по сравнению с таковыми при минимальной активности патологического процесса. При III степени активности заболевания выявлено дальнейшее увеличение уровня АТ к эластазе ($p < 0,01$) и эластину ($p < 0,05$) по сравнению с их уровнем при умеренной активности заболевания (табл. 1).

По сравнению с контрольной группой у больных РА с системными проявлениями отмечалось увеличение содержания АТ к эластазе ($p < 0,01$) и эластину ($p < 0,01$), у больных с суставной формой заболевания выявлялось умеренное увеличение уровня АТ как к эластазе, так и к эластину ($p < 0,05$) (табл. 2).

Среди больных РА с повышенными значениями АТ к эластазе (59 человек) 28 (47,5%) пациентов страдали суставной формой заболевания, а у 31 (52,5%) имелись и внесуставные проявления недуга. Что касается структуры висцеральных поражений, то у 16 (51,6%) больных наблюдалась анемия различной степени тяжести, у 13 (41,9%) – поражение центральной нервной системы по типу церебрального васкулита, у 5 (16,1%) – поражение сердца, у 4 (12,9%) – сосудистая патология, у 3 (9,7%) – поражение почек и у 2 (6,5%) больных выявлено поражение ретикулоэндотелиальной системы.

Больные СКВ. Повышение уровня АТ к эластазе наблюдалось у 28 (80%), а повышение уровня АТ к эластину – у 12 (42,9%) больных СКВ. В результате проведенной работы выявлено, что у больных СКВ I степени активности процесса (4 человека) повышено количество АТ ко всем исследуемым антигенам – эластазе и эластину, при II степени активности одновременное повышение уровня АТ к эластазе и эластину наблюдалось у 9 (37,5%) больных, изолированное повышение содержания АТ к эластазе – у 11 (45,8%), отсутствие повышения уровня АТ к обоим антигенам – у 4 (16,7%), в группе больных с III степенью активности (7 человек) повышения уровня АТ к изучаемым антигенам не наблюдалось (табл. 3).

В группе больных с повышенным уровнем АТ к эластазе (28 человек) у 26 (92,9%) больных имелись поражения кожи, у 24 (85,7%) – суставов, у 19 (67,9%) – центральной нервной системы, у 13 (46,4%) – сердца, у 11 (39,3%) – почек, у 9 (32,1%) – мышц, у 6 (21,4%) – легких, по 4 (14,3%) имели поражение сосудов и ретикулоэндотелиальной системы.

Больные ССД. Среди больных ССД (группа в целом) повышение уровня АТ к эластазе наблюдалось у 22 (78,6%) больных, к эластину – у 10 (35,7%), сочетанное повышение уровня АТ и к эластазе, и к эластину выявлено у 8 (28,6%) больных. При средней степени активности патологического процесса (21 человек) высокие уровни АТ к эластазе обнаружены у 19 (90,5%) больных, к эластину – у 9 (42,9%). При ССД с I степенью активности (3 больных) по сравнению со здоровыми отмечено увеличение уровня АТ к эластазе – у 2 (66,7%) больных ($p < 0,05$), к эластину – у 1 (33,3%) больного ($p < 0,01$). В группе больных с III степенью активности (4 больных)

Таблица 2

Уровень АТ к эластазе и эластину у больных РА в зависимости от формы заболевания

Контингент	Число наблюдений	Статистические показатели	АТ к эластазе, ед.опт.пл.	АТ к эластину, ед.опт.пл.
Здоровые	30	$M \pm m$ σ	$0,095 \pm 0,002$ 0,009	$0,130 \pm 0,005$ 0,025
Больные с суставно-висцеральной формой заболевания	48	$M \pm m$ σ	$0,251 \pm 0,003^*$ 0,018	$0,242 \pm 0,002^*$ 0,015
Больные с суставной формой заболевания	58	$M \pm m$ σ	$0,382 \pm 0,003^{**}$ 0,021	$0,353 \pm 0,002^{**}$ 0,017

* $p < 0,01$, ** $p < 0,05$.

Таблица 3

Уровень АТ к эластазе и эластину у больных СКВ в зависимости от активности патологического процесса

Контингент	Число наблюдений	Статистические показатели	АТ к эластазе, ед.опт.пл.	АТ к эластину, ед.опт.пл.
Здоровые	30	$M \pm m$ σ	$0,095 \pm 0,002$ 0,009	$0,130 \pm 0,005$ 0,025
Больные с I степенью активности	4	$M \pm m$ σ	$0,131 \pm 0,007^*$ 0,014	$0,198 \pm 0,007^{**}$ 0,013
Больные со II степенью активности	24	$M \pm m$ σ	$0,119 \pm 0,002^*$ 0,012	$0,189 \pm 0,002^{**}$ 0,010
Больные с III степенью активности	7	$M \pm m$ σ	$0,096 \pm 0,002^*$ 0,004	$0,132 \pm 0,005^{**}$ 0,014

* $p < 0,01$, ** $p < 0,05$.

Уровень АТ к эластазе и эластину у больных с ССД в зависимости от активности патологического процесса

Контингент	Число наблюдений	Статистические показатели	АТ к эластазе, ед.опт.пл.	АТ к эластину, ед.опт.пл.
Здоровые	30	$M \pm m$ σ	0,095±0,002 0,009	0,130±0,005 0,025
Больные с I степенью активности	3	$M \pm m$ σ	0,121±0,003** 0,006	0,139±0,007* 0,012
Больные со II степенью активности	21	$M \pm m$ σ	0,120±0,002** 0,010	0,128±0,002* 0,008
Больные с III степенью активности	4	$M \pm m$ σ	0,130±0,002** 0,004	0,141±0,003* 0,006

* $p < 0,01$, ** $p < 0,05$.

достоверных различий с группой здоровых лиц не обнаружено (табл. 4).

У больных ССД с различным характером течения заболевания были выявлены достоверно более высокие уровни АТ к эластазе и эластину по сравнению со здоровыми ($p < 0,05$), при подостром и остром течении процесса ($p < 0,05$) по сравнению с хроническим. Высокие значения АТ к эластазе обнаружены у 2 (66,7%) пациентов с острым, у 8 (61,5%) с подострым, у 6 (50%) с хроническим течением. Высокие уровни АТ к эластину выявлены у 1 (33,3%) больного с острым, у 4 (30,8%) с подострым, у 3 (25%) с хроническим течением.

Поражение органов и систем при ССД носит различный характер. Из 22 человек с повышенным уровнем АТ к эластазе 21 (95,5%) больной имел поражение кожи, по 18 пациентов (81,8%) – сосудов и суставов, 15 (68,2%) – легких, по 12 (54,5%) – центральной нервной системы и сердца, 10 (45,5%) – мышц, у 7 человек (31,8%) наблюдалось поражение желудочно-кишечного тракта. При этом следует отметить, что в группе больных с высоким содержанием АТ к эластазе (22 человек) поражение легких выявляли чаще (у 15 больных – 68,2%), чем в группе с низким уровнем АТ к эластазе (у 2 из 6 человек, или у 33,3%).

Эластин как структурный компонент соединительной ткани, а также эластаза как фермент, участвующий в его обмене, несомненно, вовлекаются в аутоиммунный процесс при развитии ревматических заболеваний. Так, нами выяснено, что с увеличением активности РА, при соединении висцеритов наблюдается увеличение продукции АТ к эластазе и эластину. При СКВ с увеличением степени активности отмечается тенденция к нарастанию уровня АТ к эластазе и эластину, однако у больных с III степенью активности уровень АТ к этим антигенам находится в пределах нормальных величин. Это можно объяснить тем, что у наблюдаемых нами больных с максимальной активностью заболевания отсутствует поражение суставов (у 3 из 7 наблюдаются лишь артралгии), а в суставной ткани эластин представлен в большем объеме, чем в коже, которая чаще всего и повреждается при СКВ. При ССД I и II степени активности возможно изолированное повышение АТ к тому или другому антигену, тогда как III степень ассоциируется с увеличением в сыворотке крови больных АТ к эластазе, и к эластину.

При РА такие висцеральные проявления, как анемия и сосудистые поражения, включая церебральный васкулит, сочетались с увеличением уровня АТ к эластазе и эластину в сыворотке крови больных. Патологию сосу-

дов можно объяснить содержанием в сосудистой стенке эластина, к которому и образуются аутоантитела. Прямых указаний на наличие эластазы в эритроцитах нами в литературе не обнаружено, однако, учитывая, что тромбоциты и лейкоциты, содержащие этот фермент, и эритроциты происходят от общей клетки-предшественника миелопоэза, нельзя исключить наличие эластазы и в этих клетках крови.

И при ССД, и при СКВ среди больных с повышенным уровнем АТ к эластазе и эластину в структуре клинических проявлений преобладает поражение кожи. Второе место у пациентов с СКВ занимает суставной синдром, третье – васкулопатии. У больных с ССД, напротив, чаще выявляется сосудистая патология, а затем поражение суставов. При ССД представляет большой интерес связь повышенного уровня АТ к эластазе и эластину с поражением легких. Можно предположить, что АТ к эластазе, снижая активность фермента, могут участвовать в патологическом обмене эластина, вызывая повреждение органов дыхания.

Заключение

Итак, у больных РА, СКВ и ССД выявлены достоверно более высокие уровни АТ к эластазе и эластину, чем у здоровых лиц.

Учитывая, что чаще всего у больных РА, СКВ и ССД определено изолированное повышение содержания АТ к эластазе, немного реже – сочетанное увеличение уровня АТ и к эластазе, и к эластину и лишь в единичных случаях – превышение нормальных величин АТ к эластину, можно думать, что аутоиммунный процесс в одном из звеньев обмена эластина начинается с образования аутоантител к эластазе. Эти аутоантитела, снижая активность эластазы, препятствуют нормальному обмену эластина, который приобретает свойства аутоантигена, провоцируя синтез АТ к нему.

В группе больных с сочетанным повышением уровня АТ к двум антигенам выявлена прямая корреляция между этими значениями.

По изменению уровня АТ к эластазе и эластину можно судить о тяжести патологического процесса, в частности, повышенный уровень АТ к компонентам эластинного обмена при РА и ССД может свидетельствовать о выраженности воспалительного процесса.

Нами отмечена связь между патологическим уровнем АТ к эластазе и эластину и клиническими особенностями заболевания. Так, нами определены основные синдромы РА, СКВ и ССД, которые ассоциируются с

изменением аутоиммунитета к звеньям эластинового обмена.

Исследование уровня данных АТ в сыворотке крови больных РА, СКВ и ССД иммуноферментным методом с использованием иммобилизированной формы магнитоуправляемого сорбента позволит улучшить диагностику этих ревматических заболеваний, а также расширить знания о патогенезе ряда ревматических заболеваний.

Литература

1. Гонтарь И. П. *Иммобилизированные гранулированные антигенные препараты с магнитными свойствами в диагностике и лечении ревматоидного артрита, системной красной волчанки и системной склеродермии (клинико-*

экспериментальное исследование)// *Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук. Волгоград. — 2006.*

2. Серов В. В. *Соединительная ткань (функциональная морфология и общая патология). М. — 1981.*

3. Colburn K.K., Kelly G.T., Malto M.C. et. al. *Clin. Rheumatol.*—1992. Jun; 11 (2). — P. 206–10.

4. Colburn K.K., Langga-Shariffi E., Kelly G.T. et. al. *J. Investig. Med.*— 2003. Mar; 51 (2). — P. 104–9.

5. Gminski J., Poborski W., Kasprzak A. et al. *Pol. Tyg. Lek.*—1990. Jun 18–25; 45 (25–26). — P. 513–5.

6. Robert L., Hornebeck W. *Elastin and elastases, Vol. II // CRC PRESS, 1989.*
