

Перспективы экстракорпоральной биологической терапии системной красной волчанки с использованием комбинированных сорбентов

И.А. Зборовская¹, А.С. Трофименко¹, И.П. Гонтарь¹, А.И. Романов², Е.С. Симакова¹, О.В. Парамонова³

¹ФГБУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии», Волгоград,

²ФГБУ «Центр реабилитации» УД Президента РФ,

³ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава РФ

Цель исследования – оценка эффективности и безопасности элиминации циркулирующей ДНК и ДНК-содержащих циркулирующих иммунных комплексов при системной красной волчанке (СКВ) с помощью перфузии *in vitro* через комбинированный сорбент – смесь иммобилизованной ДНКазы I и иммобилизованного C1q. Иммобилизацию производили методом эмульсионной полимеризации, конечным продуктом процесса являлись магнитоуправляемые полиакриламидные гранулы с действующим веществом, фиксированным на их поверхности. В исследование было включено 23 больных верифицированной СКВ с повышенными уровнями циркулирующих иммунных комплексов. Полученную от данных пациентов кровь пропускали через колонку, содержащую комбинированный сорбент, и оценивали динамику концентраций циркулирующих иммунных комплексов, ДНК, антител к двуспиральной ДНК, форменных элементов и общего белка крови. Показано, что при перфузии *in vitro* происходит значительное снижение содержания ДНК и циркулирующих иммунных комплексов с сопоставимой динамикой. Статистически значимых изменений других показателей не выявлено. Следовательно, комбинированный сорбент способен эффективно разрушать ДНК-содержащие аутоантигены без высвобождения патогенных антител к двуспиральной ДНК, не повреждая форменные элементы крови.

Ключевые слова: системная красная волчанка, биологическая терапия, ДНКаза I.

Purpose: To assess the effectiveness and safety of elimination of circulating DNA and DNA-containing circulating immune complexes in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) using perfusions *in vitro* via a combined sorbent – a mixture of immobilized DNA-ase I and immobilized C1q. The immobilization was made with the emulsion polymerization; the end product of this process were magnetically guided polyacrylamide granules with the active agent fixed to their surfaces. 23 patients with confirmed SLE having an increased level of circulating immune complexes were included into the study. The blood from these patients passed the column which contained the combined sorbent; then the dynamics of concentration of circulating immune complexes, DNA, antibodies to the double-stranded DNA, hemocytes and total blood protein was assessed. It has been shown that under perfusion *in vitro* one can see a considerable decrease in DNA and circulating immune complex levels. There were no revealed statistically important changes in other parameters. Conclusion: Thus, the combined sorbent can effectively destroy DNA-containing autoantigens without releasing pathogenic antibodies to double-stranded DNA and without damaging hemocytes.

Key words: systemic lupus erythematosus, biological therapy, DNA-ase I.

Наиболее ярким событием последнего десятилетия в сфере лечения ревматических заболеваний, бесспорно, является создание препаратов на основе моноклональных антител, которые взаимодействуют с различными молекулами-мишенями в организме пациента. Область применения этого метода лечения, включаемого в последнее время в понятие «биологическая терапия», быстро расширяется и включает в себя лечение не только аутоиммунных ревматических и неревматических заболеваний, но и злокачественных новообразований, бронхиальной астмы, отторжения трансплантата, дегенерации сетчатки, пароксизмальной ночной гемоглобинурии, некоторых инфекционных болезней [12, 20]. Данная тенденция коснулась в том числе и лечения системной красной волчанки (СКВ), которое в течение долгого времени изменялось сравнительно мало.

Основой лечения СКВ традиционно являются глюкокортикостероиды и, при наличии специальных показаний, цитостатические иммунодепрессанты: циклофосфамид, азатиоприн, циклоспорин А и микофенолат мофетил. Дополнительными средствами лечения СКВ в ограниченных подгруппах пациентов также считаются аминохинолиновые

препараты, нестероидные противовоспалительные препараты и плазмаферез [3]. В качестве резервных методов иммуносупрессии, которые целесообразно применять при недостаточной эффективности стандартной терапии, рассматриваются трансплантация костного мозга и применение биологических препаратов. В настоящее время наиболее перспективными для клинического применения при СКВ являются три препарата на основе моноклональных антител: ритуксимаб (антитела к CD20), эспратузумаб (антитела к CD22) и белимумаб (антитела к эндогенному стимулятору В-лимфоцитов – ВLyS). Все эти препараты напрямую или опосредованно влияют на активность В-лимфоцитарного звена иммунитета, при этом их эффект не является антигенспецифическим.

Наиболее изученным с точки зрения клинического применения при СКВ является ритуксимаб. Связываясь с молекулами CD20, этот препарат вызывает резкое уменьшение количества всех внекостномозговых клеток В-лимфоцитарного ряда в организме пациента, за исключением зрелых плазматических клеток. В нескольких открытых неконтролируемых исследованиях, а также по результатам ретроспективного анализа было показано, что у больных

с высокоактивной СКВ, рефрактерной к высоким дозам цитостатических иммунодепрессантов и кортикостероидов, при использовании ритуксимаба в большинстве случаев достигается значительное снижение активности заболевания и подавление гемолитической анемии, люпус-нефрита, кожных и неврологических проявлений [6, 11, 19]. Однако при проведении многоцентровых рандомизированных контролируемых испытаний EXPLORER и LUNAR, в которых принимали участие больные СКВ с более широким спектром активности и поражения органов, при добавлении ритуксимаба к стандартной терапии значительного улучшения эффективности лечения достичь не удалось [7, 13]. Кроме того, у пациентов, получавших ритуксимаб, нередко регистрировались аллергические реакции и инфекционные осложнения, а также отдельные случаи развития вирусопосредованной мультифокальной лейкоэнцефалопатии [18]. Как следствие данных противоречий СКВ пока не внесена в официальный перечень показаний к применению ритуксимаба, хотя не исключается возможность использования этого препарата при рефрактерных и жизнеугрожающих формах волчанки. Клинические испытания другого препарата антител к CD20, окрелизумаба, были приостановлены ввиду высокой частоты оппортунистических инфекций [10].

Несколько более перспективными выглядят предварительные результаты плацебо-контролируемых клинических испытаний эпратузумаба – препарата антител к другому поверхностному маркеру В-лимфоцитов – CD22. При его использовании у больных СКВ без поражения почек было показано значительное снижение индекса активности BILAG, а также улучшение качества жизни [5]. Эпратузумаб относится к «гуманизированным» антителам, у которых лишь антигенсвязывающие домены молекулы не являются человеческими. Ожидается, что вследствие этого частота аллергических и инфузионных реакций на введение эпратузумаба будет меньше, чем на введение ритуксимаба – химерного антитела, в молекуле которого Fab-фрагменты – мышинового происхождения, а Fc-фрагмент заимствован из человеческого генома. Тем не менее в настоящее время объем данных о результатах лечения СКВ эпратузумабом пока недостаточен для формирования обоснованных суждений.

Как известно, важную роль в регуляции селекции, пролиферации и дифференцировки В-лимфоцитов играет так называемый В-лимфоцитарный стимулятор (BLyS или BAFF) – гуморальный фактор, циркулирующая форма которого взаимодействует с рецепторами BAFF-R (BR3) на поверхности В-клеток. С помощью белимумаба – человеческого моноклональных антител к BLyS – стимулирующий сигнал данной системы можно ослабить, тем самым способствуя неспецифиче-

скому снижению активности гуморального иммунитета у больных СКВ. В недавно опубликованных плацебо-контролируемых клинических испытаниях у пациентов с СКВ, получавших белимумаб, было зафиксировано снижение активности СКВ, удлинение периода ремиссии, уменьшение концентрации сывороточного IgG и антител к двуспиральной ДНК (анти-дсДНК) при хорошей переносимости препарата [4, 10]. Однако степень снижения активности была довольно умеренной, вероятно, вследствие исключения из исследований больных без сывороточных анти-дсДНК, пациентов с высокой активностью СКВ, поражением почек и центральной нервной системы. Тем не менее данный препарат в настоящее время разрешен к применению при СКВ в качестве дополнения к стандартной терапии. Кроме того, недавно опубликованы данные о начале клинических исследований антител к другим цитокинам, неспецифически стимулирующим функцию В-лимфоцитов, – интерлейкину-6 (тоцилизумаб) и интерферону-альфа (ронтализумаб, сифалимумаб) [16]. Ведутся разработки и неиммуноглобулиновых иммуномодуляторов для лечения СКВ – низкомолекулярных толерогенов и средств, влияющих на баланс половых гормонов [14].

Несмотря на активные усилия по разработке новых средств терапии СКВ, полноценной альтернативы классическим лекарственным препаратам – глюкокортикостероидам и цитостатикам – пока не найдено. Главным препятствием для широкого внедрения всех упомянутых выше препаратов является неспецифический характер иммуносупрессии и как следствие сохранение основных недостатков, присущих стандартной схеме лечения, – узкого терапевтического диапазона и высокой частоты инфекционных осложнений. Кроме того, у инновационных препаратов на основе моноклональных антител имеются дополнительные особенности. В частности, высокая молекулярная масса IgG затрудняет проникновение через интактную кишечную стенку и, следовательно, препятствует созданию пероральных форм таких препаратов [9]. Кроме того, распределение антител в организме происходит существенно медленнее, чем у низкомолекулярных препаратов [9]. По сравнению с преднизолоном и циклофосфамидом стоимость лечения биологическими препаратами намного выше, а особенности технологии производства моноклональных антител затрудняют выпуск генерических препаратов [17]. При введении химерных иммуноглобулинов нередко выявляются аллергические реакции, а также индуцируется выработка нейтрализующих антител; решением этой проблемы может быть постепенный отказ от ксеногенных фрагментов молекулы антитела. Наконец, одномоментный лизис большого количества В-лимфоцитов под действием антител к CD20 и CD22 приводит к возрастанию аутоантигенной

нагрузки на мононуклеарные фагоциты, что потенциально способно уменьшить длительность ремиссии, индуцированной такими препаратами.

Как традиционные, так и инновационные методы лечения СКВ направлены в основном на снижение влияния патогенных аутоантител, которое осуществляется путем либо подавления их синтеза, либо удаления преформированных иммуноглобулинов из кровотока. Этот подход является общим для многих аутоиммунных заболеваний, при которых преобладает активация гуморального звена, поскольку возможность влияния на второй компонент аутоиммунной реакции, аутоантигены, как правило, крайне ограничена. Однако при СКВ ведущие аутоантигены – внеклеточные дезоксирибонуклеопропротеиды ядерного происхождения – являются, согласно современным представлениям, лишь продуктом распада клеток и не несут какой-либо значимой физиологической функции [15]. Данное обстоятельство предоставляет возможность альтернативного способа влияния на патогенность системы ДНК – анти-дсДНК путем элиминации аутоантигена и тем самым преодоления вышеупомянутых ограничений при лечении СКВ. Удобным инструментом такого воздействия может стать дезоксирибонуклеаза I типа (ДНКаза I) – фермент, одной из физиологических функций которого является разрушение ДНК и нуклеопропротеидов. Лечебное иммуномодулирующее воздействие, осуществляемое с помощью энзима, можно считать разновидностью лекарственной биологической терапии согласно наиболее широко распространенному определению последней, принятому в MESH-терминологии Medline.

Целью данного исследования являлась оценка эффективности и безопасности элиминации циркулирующей ДНК и ДНК-содержащих циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) из крови больных СКВ с помощью перфузии *in vitro* через комбинированный сорбент (смесь иммобилизованной ДНКазы I и иммобилизованного С1q). Последний предназначен для предотвращения высвобождения патогенных анти-дсДНК из ЦИК под действием ДНКазы I, а также для потенцирования эффекта фермента.

Материалы и методы

Исследование проводили в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Международной медицинской ассоциации (1996 г.), что подтверждено результатами экспертизы Регионального этического комитета. Отбор больных с верифицированной СКВ осуществляли по мере поступления в отделение ревматологии Городской клинической больницы скорой медицинской помощи №25 Волгограда при наличии информированного согласия, достижения 18-летнего возраста и исходного содержания сывороточных ЦИК более 4 Ед. Диагноз СКВ

верифицировали с помощью диагностических критериев Американской коллегии ревматологии в редакции 1997 г. [3]. Активность СКВ оценивали с помощью индекса SLEDAI-2K [3]. Оценку необратимого ущерба для здоровья производили с помощью индекса Systemic Lupus International Collaborating Clinics / American College of Rheumatology Damage Index (SLICC) [7].

Иммобилизацию производили методом эмульсионной полимеризации в потоке газообразного азота с включением магнитного материала [1, 2], отдельно для ДНКазы I и С1q, используя готовые препараты этих веществ (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США). Для получения комбинированного сорбента магнитоуправляемые гранулы с ДНКазой I и с С1q смешивали в соотношении 3:1 по объему. Перфузию гепаринизированной крови *in vitro* выполняли в стеклянной колонке рабочим объемом 20 мл, заполненной комбинированным сорбентом и оборудованной электромагнитом; скорость перфузии составляла 10 мл/ч, объем – 15 мл. Для повторного использования гранулы регенерировали в 0,1M глицин-НСI буфере рН 2,2 в течение 10 мин и затем отмывали в фосфатно-солевом буфере до нейтрального значения рН.

Содержание ЦИК в сыворотке крови определяли методом преципитации в полиэтиленгликоле и выражали в относительных единицах поглощения (Ед) при длине волны 450 нм, верхней границей нормы считали 4 Ед. Концентрацию анти-дсДНК класса IgG в сыворотке крови оценивали методом иммуноферментного анализа, используя коммерческий диагностикум (Orgentec Diagnostika GmbH, Майнц, Германия). Границей между положительными и отрицательными результатами являлось значение 20 МЕ/мл. Концентрацию ДНК в плазме крови измеряли флуориметрическим методом, применяя флуорофор «PicoGreen» (Invitrogen-Molecular Probes, Юджин, США). Содержание эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов и общего белка крови определяли унифицированными методами.

Статистический анализ полученных данных осуществляли с помощью программы SPSS 14.0 for Windows. При нормальном распределении признака его центральную тенденцию и вариабельность характеризовали как «среднее арифметическое (95% доверительный интервал)» [M (95% ДИ)], в противном случае – как «медиана (95% доверительный интервал)» [Me (95% ДИ)]. Различия считали достоверными при вероятности ошибки I типа (*p*) менее 0,05. С целью оценки изменений в ходе перфузии вычисляли темп прироста (ТП), который рассчитывали как отношение разности между конечным и исходным значениями к исходному уровню и выражали в процентах. 95% ДИ для ТП рассчитывали по методу Клоппера–Пирсона. Корреляцию оценивали с помощью коэффициента Пирсона (*r*).

Результаты и обсуждение

В исследование было включено 23 больных СКВ, отвечающих критериям отбора. Основные параметры данной группы представлены в табл. 1.

Таблица 1
Основные показатели больных СКВ

Показатель	Значение
Пол:	
женщины	22 (95,65%)
мужчины	1 (4,35%)
Средний возраст, годы; Ме (95%ДИ)	44,50 (36,14 – 51,78)
Средняя длительность болезни, годы; Ме (95%ДИ)	4,60 (4,12 – 5,06)
Средний возраст на момент дебюта болезни, годы; Ме (95%ДИ)	31,50 (27,10 – 35,22)
Течение:	
хроническое	5 (21,74%)
подострое	17 (73,91%)
острое	1 (4,35%)
Среднее значение индекса SLEDAI-2K; M (95% ДИ)	6,40 (2,34 – 10,46)
Среднее значение индекса SLICC; M (95% ДИ)	3,14 (1,28 – 5,00)

Наиболее частыми клиническими проявлениями СКВ являлись: поражение кожи (95,65%), суставов (91,30%), скелетной мускулатуры (65,22%) и почек (56,52%); реже встречались вовлечение серозных оболочек (34,78%) и нейролюпус (21,74%). Анти-дсДНК были обнаружены у 34,78%, антитела к кардиолипину – у 17,39% пациентов; антинуклеарный фактор был положительным в 56,52% случаев. Все больные СКВ получали терапию глюкокортикостероидами, при этом один из них – пульс-терапию; 5 пациентам был назначен циклофосфамид.

Распределения всех исследуемых показателей соответствовали нормальному типу. В результате

перфузии через комбинированный сорбент отмечалось статистически значимое снижение средних концентраций ЦИК и ДНК; другие маркеры существенных изменений не претерпели (табл. 2). Для всех изучаемых переменных не было выявлено статистических взаимосвязей с возрастом, вариантом течения СКВ и значениями индекса SLICC. В противоположность этому активность СКВ оказывала отчетливое влияние на результаты перфузии. Так, имела место статистически значимая корреляция значений индекса SLEDAI-2K как с ТП ЦИК ($r = -0,424, p = 0,018$), так и с ТП ДНК ($r = -0,517, p = 0,041$), но не с ТП анти-дсДНК ($r = 0,190, p = 0,883$). При сопоставлении динамики изучаемых показателей со спектром поражения органов более выраженные изменения концентрации ДНК и ЦИК отмечались лишь у больных с наличием люпус-нефрита. ТП ДНК составлял для пациентов с поражением почек -87,84 (-102,02 – -73,66)% по сравнению с -24,99 (-48,31 – -1,67)% у больных без люпус-нефрита. Для ТП ЦИК аналогичные показатели составили -60,08 (-79,24 – -40,92)% и -39,86 (-47,22 – -32,50)% соответственно. Для прочих клинико-иммунологических проявлений СКВ статистически значимых ассоциаций с постперфузионной динамикой рассматриваемых маркеров выявить не удалось.

Таким образом, перфузия нативной крови больных СКВ *in vitro* через комбинированный сорбент приводила к существенным изменениям концентраций ДНК и ЦИК, последних, вероятно, в результате расщепления ДНКазой I высокомолекулярного ДНК-антигена. В частности, имело место статистически достоверное снижение содержания ДНК и ЦИК (на 66,85 и 70,13% соответственно), при этом благодаря использованию С1q высвобождения патогенных анти-дсДНК из расщепляемых ДНК-содержащих ЦИК удалось избежать. Помимо вышеупомянутых фактов, нами было показано, что динамика содержания ЦИК и ДНК в крови была более выраженной у больных СКВ с высокой актив-

Таблица 2
Изменение маркеров катаболизма ДНК в результате перфузии крови *in vitro* через комбинированный сорбент [M (95% ДИ)]

Показатель	Исходно	После перфузии	p^*	Темп прироста, %
Концентрация ЦИК, Ед	7,80 (6,62-8,98)	2,33 (2,01-2,65)	0,009	-70,13 (-77,68 – -62,58)
Концентрация ДНК, нг/мл	147,54 (129,00-66,08)	48,91 (42,36-55,46)	0,003	-66,85 (-82,39 – -51,31)
Концентрация анти-дсДНК, МЕ/мл	42,94 (35,75-50,13)	53,01 (42,80-63,22)	0,281	23,45 (-6,84 – 53,74)
Концентрация эритроцитов, $\cdot 10^{12}/л^{-1}$	3,58 (2,44-4,72)	3,96 (2,51-5,41)	0,711	10,61 (-3,19 – 24,41)
Концентрация лейкоцитов, $\cdot 10^{12}/л^{-1}$	5,17 (1,78-8,56)	4,28 (0,59-7,97)	0,209	-17,21 (-34,43 – 0,01)
Концентрация тромбоцитов, $\cdot 10^{12}/л^{-1}$	272,63 (189,05-56,21)	245,30 (174,76-15,84)	0,370	-10,02 (-20,21 – 0,17)
Общий белок, г/л	67,29 (49,11-85,47)	73,02 (55,86-90,18)	0,436	8,52 (-3,82 – 20,86)

* Парный *t*-критерий Стьюдента (для различия до и после перфузии).

ностью заболевания и наличием поражения почек. При анализе концентрации форменных элементов и общего белка крови статистически достоверных изменений этих показателей в результате перфузии независимо от клинико-лабораторных особенностей больных-доноров крови не наблюдалось. Такой результат может свидетельствовать об отсутствии как значительного повреждающего влияния на клетки крови, так и выраженной неспецифической сорбции белковых компонентов плазмы при выполнении перфузии крови через комбинированный сорбент *in vitro*.

В целом результаты предварительного изучения эффективности и безопасности изученного нами комбинированного сорбента представляются весьма обнадеживающими. Безусловно, для более точной оценки безопасности такого метода лечения, а также степени его воздействия на синтез аутоантител и активность СКВ необходимо углубленное изучение с использованием экспериментальных моделей на лабораторных животных. Тем не менее в перспективе использование комбинированного сорбента на основе ДНКазы I и C1q способно стать важным инструментом коррекции аутоиммунных реакций против ДНК и нуклеопротеидов – ключевого звена патогенеза СКВ.

Литература

1. Гонтарь И.П. Имобилизованные гранулированные антигенные препараты с магнитными свойствами в диагностике и лечении ревматоидного артрита, системной красной волчанки и системной склеродермии: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Волгоград, 2006. – 58 с.
2. Гонтарь И.П., Симакова Е.С., Трофименко А.С., Зборовская И.А. Способ очистки крови от ДНК-содержащих иммунных комплексов с помощью комбинированного сорбента: пат. RU 2441674 C1 // №2010128583/14; заявл. 09.07.2010; опубл. 10.02.2012, Бюл. №4. – 7 с.
3. Клинические рекомендации. Ревматология / Под ред. Е.Л. Насонова. 2-е изд., испр. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 752 с.
4. Bezael S., Asher I., Elbirt D., Stoeber Z.M. // *IMAJ*. – 2012. – Vol. 14, №8. – P.508-514.
5. Calero I. // *Discov. Med.* – 2010. – Vol. 10, №54. – P.416-424.
6. Catapano F., Chaudhry A.N., Jones R.B. // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2010. – Vol. 25. – P.3586-3592.
7. Furie R., Looney R.J., Rovin B. et al. // *Arthritis Rheum.* – 2009. – Vol. 60, S. 1. – P.429.
8. Gladman D., Ginzler E., Goldsmith C. et al. // *Arthritis Rheum.* – 1996. – Vol. 39, №3. – P.363-369.
9. Keizer R.J., Huitema A.D., Schellens J.H. et al. // *Clin. Pharmacokinet.* – 2010. – Vol. 49, №8. – P.493-507.
10. La Cava A. // *Expert Opin. Biol. Ther.* – 2010. – Vol. 10, №11. – P.1555-1561.
11. Lu T.Y., Ng K.P., Cambridge G. et al. // *Arthritis Rheum.* – 2009. – Vol. 61. – P.482-487.
12. Mach J.-P. // *Cancer Immun.* – 2012. – Vol. 12. – P.11-19.
13. Merrill J., Buyon J., Furie R. et al. // *Lupus.* – 2011. – Vol. 20, №7. – P.709-716.
14. Monneaux F., Muller S. // *Arthritis Res. Ther.* – 2009. – Vol. 11, №3. – P.234-243.
15. Pisetsky D.S., Jiang N. // *Scand. J. Immunol.* – 2006. – Vol. 64, №3. – P.200-204.
16. Sifuentes Giraldo W.A., Garcia Villanueva M.J., Boteanu A.L. et al. // *Reumatol. Clin.* – 2012. – Vol. 8, №4. – P.201-207.
17. Strober B.E., Armour K., Romiti R. et al. // *J. Am. Acad. Dermatol.* – 2012. – Vol. 66, №2. – P.317-322.
18. Terrier B., Amoura Z., Ravaud P. et al. // *Arthritis Rheum.* – 2010. – Vol. 62, №8. – P.2458-2466.
19. Turner-Stokes T., Lu T.Y., Ehrenstein M.R. et al. // *Rheumatology.* – 2011. – Vol. 50, №8. – P.1401-1408.
20. Wu Y.L., Liang J., Zhang W. et al. // *Int. J. Biol. Sci.* – 2012. – Vol. 8, №10. – P.1420-1430.