

Перспективы оценки активности сывороточной ДНКазы I и её ингибиторов в иммунодиагностике системной красной волчанки

А.И. Романов, А.С. Трофименко, Е.С. Симакова, И.Ю. Алехина

Центр реабилитации Управления делами Президента РФ, Москва;
ГУ НИИ клинической и экспериментальной ревматологии РАМН, Волгоград

Результативность разработки более совершенных методов иммунодиагностики системной красной волчанки (СКВ) на современном этапе развития ревматологии во многом сдерживается недостаточной изученностью этиопатогенеза данного заболевания. К сожалению, до настоящего времени специфический для СКВ механизм активации аутоиммунитета достоверно не установлен [1]. Одним из наиболее перспективных направлений в этой области сейчас считается гипотеза о возможности взаимосвязи между индукцией иммунного ответа к аутоантигенам при СКВ и нарушением процессов апоптоза [8]. Как удалось установить, важным условием поддержания толерантности к внутриклеточным молекулам, включая ДНК и нуклеопротеиды, является эффективная элиминация апоптозного материала, осуществляемая в том числе с помощью ДНКазы I [И, 12].

Различными исследователями обнаружено снижение активности сывороточной ДНКазы I у большей части больных СКВ [3, 13, 15], а также у мышей-гибридов NZB/NZW F1, являющихся экспериментальными моделями волчанки [5, 10]. У последних также отмечено значительное снижение активности ДНКазы I в моче [10]. Происхождение данного феномена в настоящее время остается предметом дискуссии.

Первоначально снижение активности ДНКазы I связывали с увеличением содержания G-актина (основного ингибитора фермента *in vivo*) в сыворотке крови при СКВ [4,5]. Аргументом в пользу такой версии также служило отсутствие СКВ у крыс, ДНКазы I у которых, в отличие от мышиной и человеческой, не ингибируется актином [6, 7]. Однако в последующих работах не было найдено значительного различия в содержании актина между больными СКВ и здоровыми лицами [3, 15], равно как и между мышинными моделями СКВ и здоровыми мышами [10]. Не имелось актина и в моче мышей NZB/NZW F1 [10].

Для определения активности актинингибированной фракции ДНКазы I (аиДНКазы) ранее применяли метод, предложенный Р.Л. Lachmann с соавт. [4, 10]. Принцип этого метода заключается в термической денатурации актина в ходе инкубации при 50–55°C, в результате чего происходит распад комплекса актин-ДНКазы I и восстановление активности аиДНКазы. Однако, несмотря на значительно меньшую термолабильность ДНКазы I по сравнению с актином при данных условиях инкубации, нельзя исключить возможность влияния частичной инактивации фермента, равно как и его неполного высвобождения из комплекса с актином, на результаты измерения. В ранее опубликованных работах воздействие указанных аспектов на конечные значения активности аиДНКазы не изучалось. Целью первого этапа нашего исследования явилась количественная оценка вышеизложенных искажающих факторов и введение поправки для вычисления активности аиДНКазы. На втором этапе проводилась оценка влияния актина на активность сывороточной ДНКазы I при СКВ с учетом активности заболевания и спектра поражения органов.

Материал и методы исследования

Комплекс актин-ДНКазы I формировали *in vitro* в растворе, содержащем следующие компоненты: актин миокарда человека, хроматографически очищенный — 10 мкг/л, бычья

панкреатическая ДНКазы I (Merck, Германия) — 1 мкг/мл, АТФ (Reanal, Венгрия) — 0,2 ммоль/л, хлорид кальция — 0,2 моль/л, D,L-дитиотреитол (Sigma, США) — 0,5 ммоль/л, 0,004M трис-HCl буфер pH 7,4. Затем раствор инкубировали при 50±1°C в течение 10 минут, после чего немедленно охлаждали на льду до 0°C и измеряли активность ДНКазы I методом В.С. Шапот с соавт [2]. Для контроля взаимодействия фермента с актином служила проба (КВФА), отличавшаяся от основной режимом инкубации — 10 минут при 4±1°C. Для контроля исходной активности ДНКазы I (КИА) и степени её термической инактивации (КТИ) использовали раствор, отличавшийся от вышеупомянутого отсутствием актина. КТИ-пробу выдерживали в течение 10 минут при 50±1°C, а КИА-пробу — при 4±1°C. Далее все контрольные пробы немедленно охлаждали на льду до 0°C и измеряли активность ДНКазы I. Для каждой из проб определение активности проводили трехкратно, при дальнейших вычислениях использовали среднее значение экстинкции.

Полученные значения применяли для расчета следующих показателей:

$$K_{\text{КОРР}} = (E_{\text{КИА}} - E_{\text{КВФА}}) / (E_0 - E_{\text{КВФА}}) \quad (1)$$

$$K_{\text{И}} = (A_{\text{КТИ}} / A_{\text{КИА}}) \times 100\% \quad (2)$$

$$K_{\text{Р}} = (A_0 - A_{\text{КВФА}}) / (A_{\text{КТИ}} - A_{\text{КВФА}}) \times 100\% \quad (3),$$

где $K_{\text{КОРР}}$ — поправочный коэффициент, $K_{\text{И}}$ — коэффициент термической инактивации ДНКазы I, $K_{\text{Р}}$ — коэффициент реактивации аиДНКазы; E_0 , $E_{\text{КИА}}$, $E_{\text{КВФА}}$ — экстинкция соответствующих проб; A_0 , $A_{\text{КИА}}$, $A_{\text{КТИ}}$, $A_{\text{КВФА}}$ — активность соответствующих проб, определенная по их экстинкции с помощью калибровочной кривой [2]. Активность свободной ДНКазы I (сДНКазы) и аиДНКазы выражали в общепринятых единицах Kunitz [16].

Применяя поправочный коэффициент, исследовали активность сДНКазы и аиДНКазы в свежеприготовленных сыворотках крови 54 больных СКВ с различной степенью активности заболевания и 30 практически здоровых доноров (контрольная группа). Активность СКВ вычисляли по шкалам активности SLAM и SLEDAI. Кроме того, изучался уровень аиДНКазы в зависимости от поражения различных органов при СКВ: кожи, скелетной мускулатуры, суставов, почек, серозных оболочек, ЦНС, сердца, форменных элементов крови. Статистическую обработку полученных результатов производили с помощью программы SPSS for Windows release 12.0.0 (SPSS Inc., США).

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты первого этапа отражены на рис. 1. Значения коэффициентов составили: $K_{\text{КОРР}} = 1,948$, $K_{\text{И}} = 89,41\%$, $K_{\text{Р}} = 77,78\%$.

Следовательно, активность сывороточной аиДНКазы следует вычислять как разность между активностями пробы сыворотки, предварительно инкубированной 10 минут при 50°C (АТЛ), и пробы, не подвергавшейся такой инкубации (АС). Показатели активности рассчитываются по калибровочной кривой [2], исходя из разности оптической плотности соответствующих проб при 260 нм :

$$\Delta D_{\text{С}} = E_{\text{С}} - E_{\text{КД}} \quad (4)$$

$$\Delta D_{\text{ТЛ}} = 1,948 (E_{\text{ТЛ}} - E_{\text{КД}}) \quad (5),$$

Значения активности свободной и актинингибированной ДНКазы I в норме и при СКВ

Группа	сДНКазы, Ед/мл (медиана \pm m)	аиДНКазы, Ед/мл (медиана \pm t)	Корреляция между сДНКазой и аиДНКазой
СКВ в целом	0,79 \pm 0,60	0,42 \pm 0,68	$\rho = -0,260$; $p = 0,199$
СКВ-1	1,13 \pm 0,38	0,32 \pm 0,40	$\rho = 0,328$; $p = 0,198$
СКВ-2	0,00 \pm 0,10	0,92 \pm 0,88	$\rho = -0,322$; $p = 0,398$
Контроль (норма)	1,06 \pm 0,27	0,59 \pm 0,35	$\rho = -0,118$; $p = 0,241$

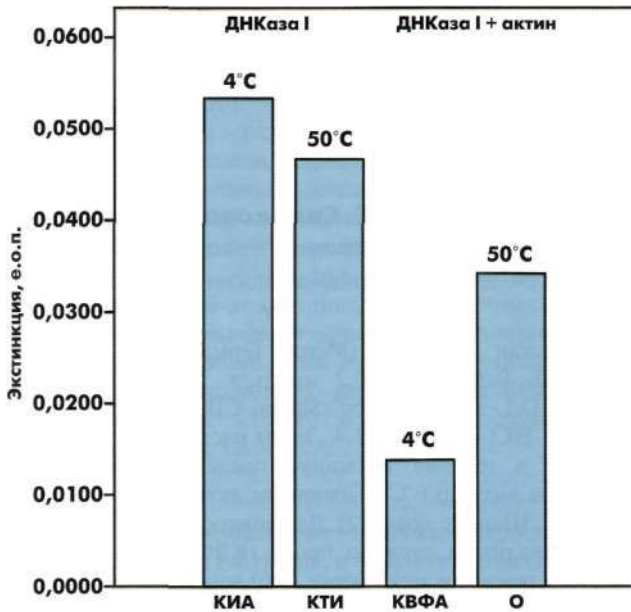


Рис. 1. Динамика активности свободной и актинингибированной ДНКазы I после термической инактивации.

где ΔD_c — разность оптической плотности для неинкубированной пробы, $\Delta D_{тл}$ — разность оптической плотности для пробы, инкубированной 10 минут при 50°C, $E_{кд}$ — экстинкция контрольной пробы на загрязненность ДНК-деполимеразами [2], E_c — экстинкция неинкубированной пробы, $E_{тл}$ — экстинкция пробы, инкубированной 10 минут при 50°C.

У больных СКВ при изучении активности сДНКазы выявлена отчетливая гетерогенность статистической совокупности (рис. 2). В связи с этим больные СКВ были разделены на 2 подгруппы, обозначенные как СКВ-1 ($n = 38$,

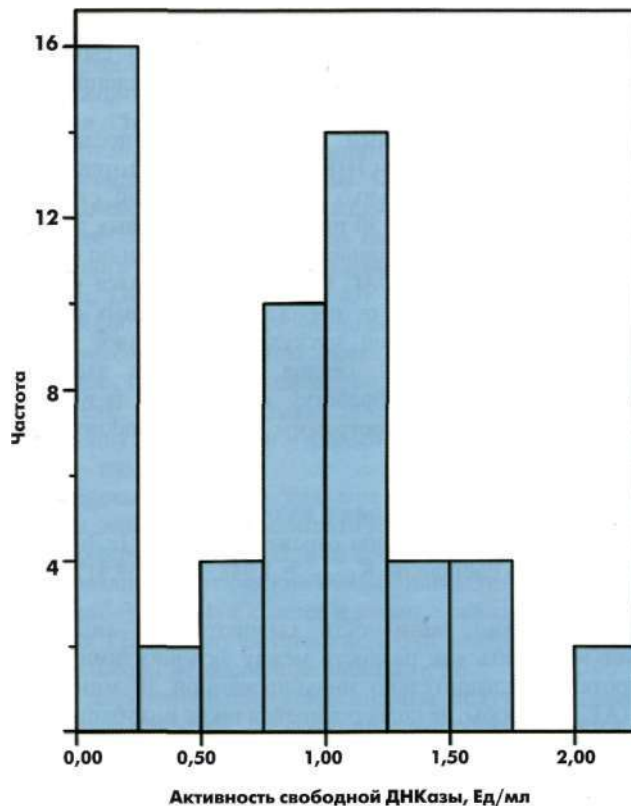


Рис. 2. Распределение активности свободной ДНКазы I у больных СКВ.

70,4% от СКВ в целом, активность сДНКазы $> 0,3$ Ед/мл) и СКВ-2 ($n = 16$, 29,6% от СКВ в целом активность сДНКазы $< 0,3$ Ед/мл). Тип распределения сДНКазы во второй подгруппе, равно как и распределения аиДНКазы во всех подгруппах, отличался от нормального. Вследствие этого в дальнейших расчетах использовались непараметрические критерии.

Результаты измерения приведены в таблице. Достоверного отличия активности сДНКазы для подгруппы СКВ-1 по сравнению с контролем не показано. Несмотря на более высокое значение активности аиДНКазы в подгруппе СКВ-2 по сравнению с СКВ-1 ($p = 0,036$), статистически значимой корреляции между активностью сДНКазы и аиДНКазы ни в одной из подгрупп выявлено не было. Также не было отмечено достоверных корреляций активности СКВ ни с аиДНКазой, ни с сДНКазой. При сравнении двух последних показателей в подгруппах, положительных и отрицательных по поражению отдельных органов, значимых различий между ними найдено не было.

Таким образом, при использованных в эксперименте параметрах термического воздействия ДНКазы I денатурируется незначительно — с потерей активности лишь на 10,6%. В то же время такой способ не позволяет добиться полного восстановления активности аиДНКазы, а всего 77,78% от нее. Однако при более агрессивных режимах нагревания следует ожидать как более значительного высвобождения аиДНКазы, так и увеличения степени термической инактивации свободной ДНКазы I, что нивелирует возможную пользу [14]. В целом, избранные нами параметры пригодны для исследования активности аиДНКазы, при условии использования поправочного коэффициента.

Упомянутый о существовании подгруппы больных СКВ с крайне низкой активностью сДНКазы сыворотки в ранее опубликованных исследованиях не содержится. Выделение нами этой подгруппы стало возможным, по-видимому, благодаря использованию значительно более чувствительного метода определения активности ДНКазы I. Вероятно, наличие такой подгруппы и определяет снижение активности ДНКазы I в целом при СКВ, поскольку прочие больные существенно не отличаются по этому параметру от нормы.

Не было выявлено статистической взаимосвязи активности аиДНКазы ни с активностью сДНКазы, ни с активностью СКВ, ни с поражением каких-либо определенных органов, что согласуется с мнением S. Chitrabamrung с соавт. [3] и M.V. Tew с соавт. [15]. Необходимо отметить, что некоторое повышение ингибирования ДНКазы I актином в подгруппе СКВ-2 не сопровождается появлением какой-либо значимой корреляционной взаимосвязи между активностями актинингибированной и свободной ДНКазы, что может свидетельствовать о наличии другой причины снижения активности последней.

Альтернативным механизмом, способным вызывать снижение активности ДНКазы I при СКВ, является анти-

телообразование. Сравнительно недавно было опубликовано первое сообщение об обнаружении у большинства больных СКВ антител к ДНКазе I класса IgG, ингибирующих ее функцию [17]. Учитывая наши данные, представляет интерес дальнейшее изучение проблемы, включая сравнение двух подгрупп больных СКВ по наличию антител к ДНКазе I и по их концентрации, а также сравнительную оценку выклада антител и актина в ингибирование исследуемого фермента.

Литература

1. Иванова М.М. Системная красная волчанка // Сигидин Я.А., Гусева Н.Г., Иванова М.М. Диффузные болезни соединительной ткани (системные ревматические заболевания): Руководство для врачей. — М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2004. — С. 253-340.
2. Шапот В.С., Чудинова И.А., Кречетова Г.Д. Методы выделения и определения активности нуклеаз // Современные методы в биохимии. В 2 т. Т.А. / Под ред. В. П. Ореховича. — М.: Медицина, 1964. — С. 267—280.
3. Chitrabamrung S., Rubin R.L., Tan E.M. // *Rheumatol. Int.* - 1981. - Vol. 1, № 2. - P. 55-60.
4. Frost P.G., Lachmann P.J. // *Clin. Exp. Immunol.* — 1968. — Vol. 3, № 5. - P. 447-455.
5. Hadjiyannaki K., Lachmann P.J. // *Clin. Exp. Immunol.* — 1972. - Vol. 11, № 2. - P. 292-295.

6. Lachmann P.J. // *Clin. Exp. Immunol.* — 1996. — Vol. 106, №2.-P. 187-189.
7. Lachmann P.J. // *Lupus.* - 2003. - Vol. 12, № 3. - P. 202-206.
8. Lorenz H.M., Herrmann M., Winkler T. et al. // *Apoptosis.* — 2000. - Vol. 5, N. 5. - P. 443-449.
9. Macanovic M., Sinicropi D., Shak S. et al. // *Clin. Exp. Immunol.* - 1996. - Vol. 106. - №1 - P. 243-252.
10. Macanovic M., Lachmann P.J. // *Clin. Exp. Immunol.* — 1997. - Vol. 108, № 2. - P. 220-226.
11. Napirei M., Karsunsky П., Zevnik B. et al. // *Nat. Genet.* — 2000. - Vol. 25, № 2. - P. 177-181.
12. Pisetsky D.S. // *Autoimmun. Rev.* - 2004. - Vol. 3, N. 7-8. - P. 500-504.
13. Sallai K. Nagy E., Derfalvy B. et al. // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* - 2005. - Vol. 12, № 1. - P. 56-59.
14. Schler П., Lindberg U., Schutt C.E., Karlsson R. // *Eur. J. Biochem.* - 2000. - Vol. 267. - P. 476-486.
15. Tew M.B. Johnson R. W., Reveille J.D. et al. // *Arthritis Rheum.* - 2001. - Vol. 44, № 10. - P. 2446-2447.
16. Kunitz M. // *J. Gen. Physiol.* - 1950. - Vol. 33, № 4. - P. 349-362.
17. Yeh T.M., Chang H.C., Liang C.C. et al. // *J. Biomed. Sci.* - 2003. - Vol. 10, № 5. - P. 544-551.

Становление гемостаза плода и новорожденного

М.А. Бессонова*, Г.Н. Буслаева*, Т.Е. Цимбалова**, Е.В. Никушкин**

*ГОУ ВПО Российский государственный медицинский университет,

**ФГУ «ЦКБ» УД Президента РФ

Гемостаз плода

Эмбриональный гемостаз — динамическая система, которая развивается стадиями, постепенно достигая уровней взрослых, но всегда поддерживает равновесие между активаторами и ингибиторами коагуляции, а также фибринолитической системой на всем протяжении внутриутробной жизни [16].

Многие коагуляционные белки в эмбриональный период уже синтезированы, но с середины внутриутробного периода продукция данных белков приостанавливается до момента родов. Причины данных процессов в настоящее время не известны [11].

В табл. 1 представлены факторы коагуляции в зависимости от срока гестации в сравнении со здоровыми новорожденными и взрослыми [16].

Уровень фактора II значительно увеличивается в III триместре беременности. Увеличение уровней факторов II, IX и X отмечается при рождении, но остается сниженным по сравнению с взрослыми. Кроме того, PIVKA уровни (функционально неполноценные молекулы предшественницы коагулирующих белков, образующиеся при дефиците витамина K и действующие как антикоагулянты), определяемые твердофазным иммуноферментным анализом, были ниже у плода, чем у новорожденного и взрослого человека, независимо от срока гестации.

Уровни факторов V и VIII выше, чем уровни K-витаминзависимых факторов и

достаточно стабильны в период 19—30 недель гестации [16]. Увеличение их до уровней взрослых происходит к 20 неделям гестации. Поскольку фактор VIII созревает рано, диагноз гемофилии А может быть поставлен внутриутробно после 18

Таблица 1

Факторы коагуляции плода в зависимости от срока гестации в сравнении со здоровыми новорожденными и взрослыми

Показатель	19-23 нед.	24-29 нед.	30-38 нед.	Новорожд.	Взрослый
Протромбиновое время, с	32,5±13,0	32,2±12,5	22,6±7,0	16,7±5,6	13,5±2,4
АЧТВ, с	168,8±83,5	154,0±61,5	104,8±26,0	44,3±8,5	33,0±7,0
Тромбиновое время, с	34,2±10,1	26,2±2,0	21,4±3,2	20,4±5,0	14,0±2,0
Фактор I, г/л (фибриноген)	0,85±0,47	1,12±0,50	1,35±0,20	1,68±0,75	3,0±1,36
Фактор II, %	16,9±7,0	19,9±10,0	27,9±17,5	43,5±18,5	98,7±27,5
Фактор V, %	32,1±11,5	36,8±12,5	48,9±23,5	89,9±45,0	99,8±37,5
Фактор VII, %	27,4±10,0	33,8±15,0	45,9±15,5	52,5±25,0	101,3±31,0
Фактор VIII, %	34,5±16,0	35,5±16,0	50,1±25,5	94,3±56,0	101,8±60,0
Фактор IX, %	10,1±4,0	9,9±5,0	12,3±9,5	31,8±17,5	104,8±36,0
Фактор XI, %	13,2±5,5	12,1±8,0	14,8±10,0	37,2±24,5	100,2±32,5
Фактор XII, %	14,9±9,5	22,7±17,0	25,8±19,5	69,8±40,0	101,4±39,5
Прекалликреин, %	12,8±5,5	15,4±9,0	18,1 ±10,0	35,4±16,0	99,8±35,0
Высокомолекулярный кининоген, %	15,4±6,0	19,3±8,0	23,6±11,0	38,9±12,5	98,8±33,5