

УДК 577.175.8; 616.72-002.77-078

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЕСТЕСТВЕННЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ
К АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕМУ ФЕРМЕНТУ
И ВАЗОАКТИВНЫМ ПЕПТИДАМ В СЫВОРОТКАХ КРОВИ
БОЛЬНЫХ СИСТЕМНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ
СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ**

М. А. Мягкова¹, Т. В. Абраменко¹, И. П. Киселев¹, М. Л. Станислав^{2*}, О. А. Кост^{3*},
И. И. Никольская³, Е. В. Гарац³, Алекперов Р. Т.²

¹Институт физиологически активных веществ РАН; ²Институт ревматологии РАМН;
³кафедра энзимологии химического факультета Московского государственного
университета им. М.В. Ломоносова; Воробьевы горы, Москва 119899, Россия; факс:
(095)-939-54-17, e-mail: kost@enzyme.chem.msu.ru

Впервые были определены уровни естественных антител (е-Ат) к ангиотензин-превращающему ферменту (АПФ) класса IgM у больных системными заболеваниями соединительной ткани – системной красной волчанкой (СКВ), ревматоидным артритом (РА) и системной склеродермией (ССД). В целом по группам достоверных различий между уровнями анти-АПФ не выявлено. Установлено, что активность АПФ в сыворотке больных СКВ и ССД была ниже, чем в контрольных образцах. Анализ IgM е-Ат к вазоактивным пептидам показал повышение количества е-АТ к брадикинину (БК) в сыворотках больных СКВ и РА по сравнению с донорами и значительное снижение уровня антител к ангиотензину II (АII) у больных ССД. При СКВ самые низкие уровни е-АТ ко всем исследованным медиаторам наблюдались у больных с нефритом, а уровни, превышающие значения доноров, – у больных с мочевым синдромом. У больных с нефритом уровень антител к вазопрессину (ВП) был ниже, чем у доноров. Для пациентов с РА наблюдались самые высокие значения е-Ат ко всем медиаторам при суставной форме заболевания. Отмечены различия по количеству циркулирующих е-Ат к БК по сравнению с донорами как в группе в целом, так и в подгруппах с системными проявлениями и суставной формой. Для ССД отмечены различия между подгруппой с диффузной и лимитированной формами по уровням е-Ат к БК и к АПФ.

Ангиотензин-превращающий фермент (АПФ, пептидил дипептидаза, КФ 3.4.15.1) играет важную роль в регуляции гомеостаза, участвуя в функционировании ренин-ангиотензин-альдостероновой и калликреин-кинино-

вой систем. АПФ гидролизует декапептид ангиотензин I (AI) путем отщепления С-концевого дипептида (гистидил-лейцина), образуя прессорный октапептид ангиотензин II (AII). Кроме того, он участвует в деградации

*Адресат для переписки.

брадикинина – наиболее активного сосудистого вазодилатора. АПФ обнаружен во многих тканях, в частности в нервных клетках, в легочной ткани, в канальцах и клубочках почек, клетках семенных придатков, сердца, а также в циркулирующих клетках крови, а именно в моноцитах [1]. Однако основным местом локализации фермента является сосудистый эндотелий, где концентрация АПФ значительно выше, чем в циркулирующей крови. Установлена роль АП в патогенезе застойной сердечной недостаточности и артериальной гипертензии [2], разрабатывается гипотеза, что АПФ, как и антиген фактора фон Виллебранда, является маркером поражения эндотелия при заболеваниях почек [3], а также при склеродермии [4] и других патологических состояниях. В последние годы АПФ привлекает внимание исследователей способностью влиять на иммунологические и воспалительные процессы. Показано, что низкая концентрация АПФ приводит к повышенным уровням брадикинина, субстанции Р, а те, в свою очередь, влияют на пролиферацию лимфоцитов, хемотаксис нейтрофилов и моноцитов [5] и высвобождение в кровь цитокинов (интерлейкина-6, интерлейкина-1, фактора некроза опухоли) [6].

С развитием высокочувствительных методов иммунологических исследований было установлено, что в сыворотках здоровых людей содержатся в низких концентрациях антитела практически ко всем группам эндогенных антигенов. В отличие от патологических, вызывающих аутоиммунные заболевания, они получили название естественных антител (е-Ат) [7, 8]. При повышении уровня эндогенных соединений или их метаболитов, происходит индукция иммунологических механизмов, что приводит к повышению уровня е-Ат против этих веществ, а затем и к их выведению с целью сохранения химического гомеостаза. Этот процесс протекает постоянно и является обязательным дополнением к ферментативным реакциям, протекающим в организме.

Цель данного исследования – оценка уровней е-Ат к АПФ и эндогенным медиаторам, влияющим на тонус сосудов (брадикинин, ангиотензин II, вазопрессин), а также выявление уровней активности сывороточного АПФ у больных с системными заболеваниями соединительной ткани, являющихся аутоиммунными болезнями.

Методы исследования

Исследования проводили на сыворотках крови больных ревматическими заболеваниями: системной красной волчанкой (СКВ), ревматоидным артритом (РА), системной склеродермией (ССД). Контрольную группу составили 10 практически здоровых доноров.

Характеристика больных. I группа включала больных СКВ (30 человек), II группа – больных РА (19 человек, из них 12 – с системными проявлениями заболевания, 7 – с суставной формой), III группа состояла из 36 больных ССД (из них 22 человека с лимитированной формой и 14 – с диффузной). Группы были сопостави-

мы по полу и возрасту ($p > 0,05$, где p – коэффициент достоверности [9]. При $p < 0,05$ ошибка эксперимента не превышает 5%).

Выделение АПФ. АПФ выделяли из мембранной фракции почек человека экстракцией в 50 мМ фосфатном буфере (рН 7,5), содержащем 150 мМ NaCl, 1 мкМ ZnCl₂, 0,1% Тритон X-100. Затем фермент очищали до электрофоретической гомогенности посредством аффинной хроматографии на лизиноприл-агарозе. Элюцию фермента осуществляли с помощью 50 мМ боратного буфера (рН 9,5), содержащего 0,1% Тритона X-100. Концентрацию активных молекул АПФ определяли с помощью стехиометрического титрования специфическим ингибитором АПФ лизиноприлом, как описано в [10].

Определение естественных антител к АПФ проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА). Планшеты сенсibilizировали раствором антигена (100 мкл в лунку) в 0,02 М карбонатном буфере (рН 9,5) в течение 18 ч при 4°. При этом в ряду с 1 по 10 проводили титрование антигена с помощью двойных разведений, начиная с концентрации 10 мкг/мл. Затем после инкубации планшеты отмывали трижды 0,05%-м раствором Твин-20 в забуференном физиологическом растворе (ЗФР) при рН 7,2 и вносили в лунки по 100 мкл исследуемой сыворотки в ЗФР, содержащем 0,1% Твин-20, которую предварительно разбавляли в ряды с помощью двойных разведений, начиная с разведения сыворотки 1:100. После инкубации в течение 1 ч при 37° планшеты отмывали, как описано выше, и добавляли в лунки конъюгаты антител против IgM человека, меченные пероксидазой хрена, в разведении 1:2000. Планшеты инкубировали 1 ч при 37°, промывали, как описано выше, и заполняли субстратной смесью, содержащей 1,25 мМ *o*-фенилендиамина и 12% перекиси водорода в 0,05 М фосфатно-цитратном буфере (рН 5,0). После 20-минутного инкубирования в темноте добавляли по 50 мкл 10% раствора серной кислоты и измеряли оптическую плотность при длине волны 492 нм (D_{492}). Затем строили кривые изменения зависимости оптической плотности как от концентрации сорбируемого антигена, так и от разведения исследуемой сыворотки для выбора условий индивидуального тестирования.

На основании разработанного ИФА анализировали содержание е-Ат к АПФ в индивидуальных сыворотках больных и доноров. Планшеты сенсibilizировали антигеном в концентрации 5 мкг/мл, разведение сыворотки составляло 1:200.

Определение антител против брадикинина (БК), ангиотензина II (АП), вазопрессина (ВП) проводили с помощью метода ИФА. Конъюгаты соответствующих антигенов были синтезированы на полимерной матрице 4-политрофенилакрилата по разработанным ранее методикам [11, 12].

Ферментативную активность АПФ в сыворотке крови измеряли по начальной скорости реакции гидролиза 50 мкМ раствора Cbz-Phe-His-Leu на спектрофлуориметре

«Hitachi MPF-4» (Япония), определяя продукт реакции (His-Leu) с помощью *o*-фталевого альдегида [10]. За единицу активности принято количество АПФ, расщепляющее 1 мкМ субстрата за 1 мин при 37°.

Полученные результаты были статистически обработаны на ПЭВМ в системе STATISTICA® для Windows с использованием общепринятых в биометрии методик.

Результаты и их обсуждение

В результате проведенного исследования были впервые определены уровни *e*-Ат к АПФ у больных системными заболеваниями соединительной ткани (таблица). Из-за значительных индивидуальных колебаний в целом по группам достоверных различий между уровнями анти-АПФ не было выявлено, но обращает на себя внимание некоторое повышение средних значений в группе больных СКВ и снижение в группе больных ССД. Именно при этих заболеваниях в большей степени наблюдаются сосудистые нарушения. Максимальные значения уровней анти-АПФ во всех группах больных более высокие, чем у здоровых доноров, что отражает типичную для аутоиммунных заболеваний гиперпродукцию антител.

Результаты оценки активности сывороточного АПФ (M±SD) представлены на рис. 1. Активность АПФ в крови больных СКВ (0,0248±0,0183) и ССД (0,0221±0,0218) почти в 2 раза ниже уровня активности у здоровых доноров (0,0442±0,0285), различия достоверны ($p = 0,016$ и $p = 0,011$ соответственно). В группе пациентов с РА активность АПФ определяли лишь у 8 человек, и у них средние значения не отличались от среднего уровня доноров. Снижение активности сывороточного АПФ при ССД подтверждено рядом ранее проведенных исследований [13] и косвенно отражает степень поражения эндотелия при данном заболевании [5]. Литературные данные по активности АПФ в сыворотке крови при СКВ не столь однозначны. С одной стороны, показано, что при люпус-нефрите наблюдается локальная внутривисцеральная активация ренин-ангиотензиновой системы [14] с повышением уровня АП и увеличением активности АПФ. С другой стороны, отмечается связь между показателями активности СКВ и генотипом II, обусловленным полиморфизмом 16 интрона гена, кодирующего АПФ. Генотип II связан с пониженным уровнем АПФ в крови [15, 16].

Литературные данные о степени активности АПФ при РА также противоречивы. Наблюдались как сравнимые с

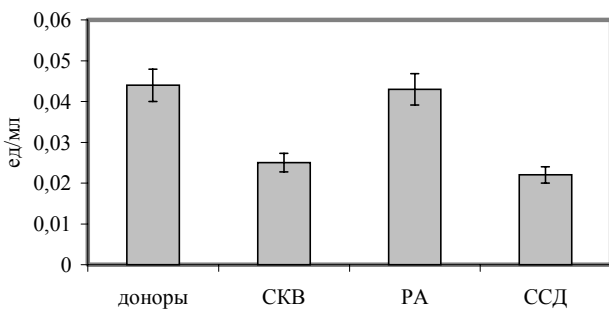


Рис. 1. Зависимость уровня активности АПФ в сыворотках больных различными заболеваниями соединительной ткани

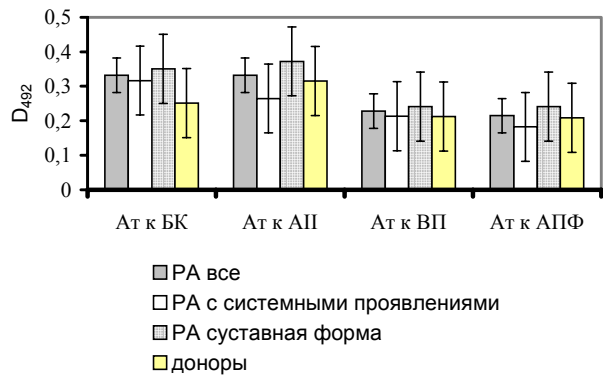


Рис. 2. Зависимость уровней естественных антител в сыворотках больных различными формами ревматоидного артрита.*- Различия достоверны (по сравнению с донорами).** - Различия достоверны между группами (РА с системными проявлениями и РА суставная форма)

уровнем доноров [17], так и высокие значения активности АПФ в сыворотке крови [18]. Отмечено, что при слегка повышенных уровнях активности АПФ в сыворотке активность АПФ в синовиальной жидкости более низкая. При этом степень активности фермента в синовиальной жидкости при РА выше, чем у больных с заболеваниями суставов, не относящихся к группе аутоиммунных, в частности, при остеоартрите [17].

В нашем исследовании не было получено корреляций между уровнями анти-АПФ и активностью самого фермента. Возможно, это связано с тем, что обнаруженные нами антитела могут образовываться к АПФ эндотелия сосудов или плазмы, в то время как для определения их использовался АПФ мембранной фракции почек человека. Кроме того, как уже отмечалось, АПФ может влиять на функцию лимфоцитов, и скорость и количество образования антител к нему могут не иметь линейной зависимости от активности фермента.

Уровни *e*-Ат к вазоактивным пептидам также представлены в таблице. Достоверные различия по группам в целом по отношению к донорам отмечены для антител к брадикинину в сыворотках больных СКВ и РА (в обоих случаях их уровни выше, чем у здоровых лиц, $p < 0,05$) и отмечено значительное снижение уровня антител к АП у больных ССД ($p = 0,000073$). Объяснение полученных фактов требует дополнительных исследований, но необходимо отметить, что группы больных всех нозологий неоднородны по клиническим проявлениям, характеру течения заболевания и активности болезни в момент исследования. Кроме того, проводимая терапия также может влиять на концентрацию в крови эндогенных медиаторов, на скорость их деградации и, соответственно на процессы образования и элиминации аутоантител.

На рис. 2 представлены уровни *e*-АТ у больных РА (вся группа в целом и 2 подгруппы с системными проявлениями и с суставной формой) в сравнении с донорами. Отмечены достоверные различия по количеству циркулирующих *e*-Ат к БК по сравнению с донорами как в группе в целом ($p = 0,0074$), так и в подгруппах (с системными проявлениями $p = 0,0478$, с суставной формой $p = 0,0236$). У больных с суставной формой был самый

Уровни естественных антител к ангиотензин-превращающему ферменту (АПФ) и вазоактивным пептидам у больных системными заболеваниями соединительной ткани (M±SD)

Группы	Уровень антител к АПФ		Антитела к брадикинину (D ₄₉₂)	Антитела к ангиотензину II (D ₄₉₂)	Антитела к вазопрессину (D ₄₉₂)
	Среднее значение (D ₄₉₂)	Колебание значений (D ₄₉₂)			
Системная красная волчанка	0,23	0,10–0,51	0,330±0,125*	0,318±0,144	0,227±0,104
Ревматоидный артрит	0,21	0,08–0,46	0,332±0,095*	0,313±0,122	0,228±0,007
Системная склеродермия	0,16	0,01–0,39	0,228±0,064	0,201±0,061**	Не определялись
Доноры	0,21	0,01–0,29	0,252±0,006	0,316±0,114	0,213±0,034

* $p < 0,05$ (в сравнении с донорами). ** $p < 0,001$ (в сравнении с донорами).

высокий уровень е-Ат к БК, как, впрочем, и уровни е-АТ к другим субстратам. Этот феномен представляет особый интерес, так как суставы поражены у всех больных, а ревматоидный васкулит бывает только у больных с системными проявлениями, и можно было бы предполагать обратное соотношение.

Анализ полученных данных показал, что при СКВ у больных с нефритом уровень антител к ВП достоверно ниже, чем у доноров ($p = 0,03$). В то же время у больных с мочевым синдромом (т.е. с умеренным поражением почек) он был даже выше, чем у доноров, хотя достоверно не отличался от среднедонорского уровня. Различия между подгруппами больных СКВ по данному параметру достоверно отличались ($p = 0,015$). В отношении е-АТ к БК наблюдается та же зависимость. Самые высокие уровни антител к БК среди больных СКВ наблюдались у больных с мочевым синдромом ($0,371 \pm 0,144$), отличия от доноров достоверны ($p = 0,0078$), у больных с нефритом они были ниже ($0,275 \pm 0,066$), отличия между подгруппами больных СКВ также достоверны ($p = 0,028$). При сравнении уров-

ней антител к БК, АП, ВП у больных как с тяжелым (нефрит), так и с умеренным поражением почек (мочевой синдром) в сравнении с донорами отмечена одна и та же тенденция: при нефрите наблюдались самые низкие уровни циркулирующих е-Ат. Хотя последние традиционно не считаются участвующими в патогенезе заболеваний, полученные данные могут послужить основой для дальнейших исследований, так как при нефрите происходит отложение иммунных комплексов в почках, что вызывает снижение их концентрации в сыворотке. При ССД достоверные различия между подгруппой с диффузной ССД и лимитированной получены по е-Ат к БК ($p = 0,009$) и е-Ат к АПФ ($p = 0,018$).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при системных заболеваниях соединительной ткани отмечаются особенности в уровнях циркулирующих е-Ат, они зависят как от нозологий, так и от особенностей клинической картины. Для уточнения физиологической или патологической роли антител к эндогенным медиаторам требуются дальнейшие исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yamada, H., Fabris, B, Allen, A.M., Jackson, B., Johnston, C.I., Mendelsohn, A.O. // *Circ. Research*. 1991. **68**. P. 141.
2. Hirsch, A.T., Dzau, D.J. // *Heart Failure and Arrhythmias*. / Eds. J. Brachmann, R. Dietz, W. Kubler, Springer-Verlag, 1990. P. 7.
3. Romer F.K., Schmitz O. // *Clin. Nephrol.* 1984. **21**. P. 178.
4. Matucci-Cerinic M., Pignone A., Lotti T., Sptillantini J., Kurradi C., Leontini G., Iannone F., Falcini F., Hirsch, A.T., Dzau, D.J. // *Heart Failure and Arrhythmias*. / Eds. J. Brachmann, R. Dietz, W. Kubler, Springer-Verlag, 1990. P. 142.
5. Tiffany C.W., Burch R.M. // *FEBS Lett.* 1989. **247**. P. 189.
6. Vandekerckhove F., Opderakker G., Ranst M. van, Lenaerts J.P., Put W., Billian A., Damme J. van // *Lymphokine Cytokine Res.* 1991. **10**. P. 285.
7. Ковалев И.Е., Полевая О.Ю. // Антитела к физиологически активным соединениям. М., 1981.
8. Lorber, M., Kra-Oz, Z., Shoefeld, Y. // *Lupus*. 1995. **4**. Suppl. 2. P. 108.
9. Гланц С. // *Медико-биологическая статистика*. М., 1999. С. 117.
10. Биневский П.В., Никольская И.И., Позднев В.Ф., Кост О.А. // *Биохимия*. 2000. **65** (в печати).
11. Мяжкова М.А., Бачурин С.О., Савицкий А.А., Станислав М.Л., Балабанова Р.М., Жохова Н.И., Панченко О.Н., Савицкая Ю.А. // *Клин. лаб. диагн.* 1999. № 4. С. 20.
12. Мяжкова М.А., Панченко О.Н., Трубачева Ж.Н. // *Ж. экп. клин. диагн.* 1997. № 6. P. 18.
13. Matucci Cerinic M., Borsotti M., Barbieri R., Lombardi A. // *Clin. Rheumatol.* 1987. **6**. P. 300.
14. Harris R.C., Martinez-Maldonado M. // *Miner Electrolyte Metab.* 1995. **21**. P. 328.
15. Rigat B., Hubert C., Alhenc Gelas F., Cambien F., Corvol P., Soubrier F. // *J. Clin. Invest.* 1990. **86**. P. 1343.
16. Sato H., Akai Y., Iwano M., Kurumatany N., Kurioka H., Kubo A., Yamaguchi T., Fujimoto T., Dohi K. // *Lupus*. 1998. **7**. P. 530.
17. Lowe J.R., Dixon J.S., Guthrie J.A., Mtwhinney P. // *Ann. Rheum. Dis.* 1986. **45**. P. 921.
18. Sheikh I.A., Kaplan A.P. // *Arthr. Rheum.* 1987. **30**. P. 138.