

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-002.77

Гонтарь И.П.<sup>1</sup>, Емельянова О.И.<sup>1</sup>, Русанова О.А.<sup>1</sup>, Маслакова Л.А.<sup>1</sup>, Зборовская И.А.<sup>1,2</sup>, Шилова Л.Н.<sup>2</sup>

# Антитела к ферментам антиоксидантной системы как патогенетический фактор развития анемии при ревматоидном артрите

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А.Б. Зборовского», 400138, г. Волгоград, Россия, ул. Землячки, д. 76;

<sup>2</sup>Волгоградский государственный медицинский университет, 400131, г. Волгоград, Россия, пл. Павших борцов, д. 1

**Цель** исследования – изучение антителообразования к супероксиддисмутазе, глутатионредуктазе, каталазе у больных ревматоидным артритом и выяснение их роли в патогенезе сопутствующей анемии.

**Методика.** Проведено обследование 104 больных ревматоидным артритом с различной степенью активности процесса, формой и характером течения. Диагноз ревматоидного артрита ставился на основании клинико-лабораторного и инструментального обследования больных согласно системе диагностических критериев Американской ревматологической ассоциации, предложенной в 2010 году (ACR / EULAR). Выраженность анемии оценивали по уровню гемоглобина и количеству эритроцитов. Определение уровня антител проводили методом непрямого иммуноферментного анализа [ELISA тест] с использованием иммобилизованных магнитосорбентов, представляющих собой полиакриламидные гранулы, содержащие магнитный материал и перечисленные ферменты в качестве антигена. В качестве антигенов использовались коммерческие отечественные препараты: супероксиддисмутазы из эритроцитов человека (активность 30 Ед/мг), в исследованиях использовали фермент в рабочем разведении по белку – 100 мкг/мл, глутатионредуктаза (активность 340 Ед/мг) – 200 мг/мл по белку, каталаза (активность 380 Ед/мг) – 1,4 мг/мл по белку. Учитывая достаточную относительную молекулярную массу глутатионредуктазы и каталазы, иммобилизацию проводили методом эмульсионной полимеризации в потоке газообразного азота с включением магнитного материала. В связи с небольшой относительной молекулярной массой эритроцитарной фиксации супероксиддисмутазы иммобилизацию фермента проводили путем пришивки его молекулы глутаровым альдегидом к инертной полиакриламидной грануле, содержащей магнитный материал. «Чистые» антитела к ферментам получали с помощью соответствующего антигенного иммуносорбента. Источником специфических иммуноглобулинов служили сыворотки больных ревматоидным артритом с заранее определенным высоким титром антител (экстинция > 0,2). После инкубации антигенного иммуносорбента и растворимой формы фермента с полученными антителами был проведен анализ изменения активности энзима. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программных пакетов Statistica 6.0, Excel 5.0, Statgraphics 3.0, SPSS 12.0.

**Результаты.** Выявлена зависимость между уровнем антител к супероксиддисмутазе, глутатионредуктазе и каталазе и активностью, течением и формой болезни. Полученные результаты свидетельствуют о повышении антителогенеза к этим ферментам по мере активизации патологического процесса. Выявленное снижение активности энзимов, связанное с выработкой антител к ним, происходит, очевидно, вследствие блокирования специфическими иммуноглобулинами активного центра фермента, являющегося одновременно и антигенной детерминантой. Об участии антител к ферментам в патогенезе анемии у больных ревматоидным артритом свидетельствует обратная корреляция между содержанием антител и уровнем гемоглобина. У больных ревматоидным артритом с умеренно выраженной анемией содержание антител было значимо выше, чем у пациентов без анемии, но ниже, чем у пациентов с тяжелой формой анемии.

**Заключение.** Антитела к супероксиддисмутазе, глутатионредуктазе и каталазе являются одним из патогенетических факторов развития анемии и могут служить критерием тяжести заболевания.

**Ключевые слова:** супероксиддисмутазы; глутатионредуктаза; каталаза; антитела; ревматоидный артрит.

**Для цитирования:** Гонтарь И.П., Емельянова О.И., Русанова О.А., Маслакова Л.А., Зборовская И.А., Шилова Л.Н. Антитела к ферментам антиоксидантной системы как патогенетический фактор развития анемии при ревматоидном артритом.

*Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(4): 96-100.

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.04.96-100

**Для корреспонденции:** Емельянова Ольга Ивановна, e-mail: emelyanova.vlg@mail.ru

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила** 26.03.2018

Gontar I.P.<sup>1</sup>, Emelianova O.I.<sup>1</sup>, Rusanova O.A.<sup>1</sup>, Maslakova L.A.<sup>1</sup>, Zborovskaia I.A.<sup>1,2</sup>, Shilova L.N.<sup>2</sup>

## Antibodies to enzymes of antioxidant system as a pathogenetic component of anemia in rheumatoid arthritis

<sup>1</sup>FSBI Research Institute for Clinical and Experimental Rheumatology,  
76 Zemlyachki str., Volgograd, 400138, Russia;

<sup>2</sup>Volgograd State Medical University,  
Volgograd, Russia

**The aim** was to study formation of antibodies to superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase (GR), and catalase (CAT) in patients with rheumatoid arthritis (RA) and to elucidate the role of the antibodies in development of anemia.

**Methods.** The antibodies were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using immobilized magnetic sorbents, polyacrylamide granules containing a magnetic substance and the enzymes (SOD, GR, CAT) as antigens. Antibody concentration was expressed in absorbance units. Rheumatoid arthritis was diagnosed based on clinical and instrumental evaluation of patients according to the criteria of the American College of Rheumatology (ACR/EULAR, 2010). Statistical analysis was performed using variation statistics, and results were expressed as mean±SEM. Central tendencies were compared using the Student's test. Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ . ELISA was performed on blood serum from 104 rheumatoid arthritis patients with different disease activity. The following commercial reagents (Russia) were used as antigens: superoxide dismutase from human RBCs (30 U/mg), which was used in the study in a working protein dilution of 100 mcg/ml; glutathione reductase (340 U/mg) which was used in the study at a protein concentration of 200 mg/ml; and catalase (380 U/mg), which was used in the study at a protein concentration of 1.4 mg/ml. Since the relative molecular weights of glutathione reductase and catalase were sufficient, immobilization was performed by emulsion polymerization in a flow of gaseous nitrogen including a magnetic material. Due to a low relative molecular weight of SOD from RBCs this enzyme was immobilized by coupling to an inert polyacrylamide granule containing a magnetic material, using glutaric aldehyde. «Pure» antibodies to the enzymes were obtained using a respective antigen immunosorbent. Specific immunoglobulins were obtained from blood serum of rheumatoid arthritis patients with a known high antibody titer (extinction > 0.2). Enzymatic activity was analyzed following incubation of the antigen immunosorbent and soluble enzyme with the obtained antibodies.

**Results.** Production of antibodies to the studied enzymes increased with increasing severity of the disease. The decrease in enzymatic activity associated with production of respective enzyme antibodies is apparently due to inhibition by specific immunoglobulins of the active center, which is also the antigenic determinant.

**Conclusion.** Antibodies to SOD, GR, and CAT are pathogenetic factors in the development of anemia; they may serve as a criterion for disease severity.

**Keywords:** superoxide dismutase; glutathione reductase; catalase; antibodies; rheumatoid arthritis.

**For citation:** Gontar I.P.<sup>1</sup>, Emelianova O.I.<sup>1</sup>, Rusanova O.A.<sup>1</sup>, Maslakova L.A.<sup>1</sup>, Zborovskaia I.A.<sup>1,2</sup>, Shilova L.N.<sup>2</sup> Antibodies to enzymes of antioxidant system as a pathogenetic component of anemia in rheumatoid arthritis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(4):96-100.

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.04.96-100

**For correspondence:** **Emelianova O.I.**, Candidate of Medical Sciences, Leading Researcher) Federal State Budgetary Institution «Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology named after A.B. Zborovsky», 76 Zemlyachki str., Volgograd, 400138, Russia; E-mail: emelianova.vlg@mail.ru

### Information about authors:

Gontar I.P., <http://orcid.org/0000-0001-9920-1360>

Emelianova O.I., <http://orcid.org/0000-0003-3951-8985>

Rusanova O.A., <http://orcid.org/0000-0002-7080-2442>

Maslakova L.A., <http://orcid.org/0000-0003-4718-732X>

Zborovskaia I.A., <http://orcid.org/0000-0002-8824-0409>

Shilova L.N., <http://orcid.org/0000-0002-0438-8554>

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Received** 26.03.2018

## Введение

Согласно данным литературы, анемия развивается у 30-70% больных ревматоидным артритом (РА) [1, 2]. Одни авторы рассматривают анемию как осложнение РА, другие считают анемию симптомом заболевания [3, 4].

В патогенезе анемии при РА могут играть роль различные факторы, в том числе образование антител к ферментам антиоксидантной системы (АОС) [5].

К ферментам, обладающим антиоксидантным действием, относятся марганец-медьсодержащий фермент – супероксиддисмутаза (СОД), глутатионредуктаза (ГР), каталаза (КАТ), глутатионпероксидаза (ГП), церулоплазмин (ЦП), пероксидаза, цитохромоксидаза, некоторые медь-содержащие оксидазы и протеолитические ферменты клетки.

Учитывая характерные иммунологические нарушения, наблюдаемые при РА, логично предположить, что снижение активности этих ферментов может происходить как в результате участия их в дезактивации активных форм кислорода (АФК), так и вследствие гиперпродукции антител к этим ферментам.

**Цель исследования** – изучение антителообразования к супероксиддисмутазе, глутатионредуктазе, каталазе у больных ревматоидным артритом и выяснение роли антител в патогенезе сопутствующей анемии.

### Методика

В исследовании приняли участие 104 больных ревматоидным артритом и 30 – здоровых лиц, которые дали письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Исследование проводили в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Международной медицинской ассоциации [6]. Работа одобрена региональным этическим комитетом. Диагноз РА ставился на основании клинико-лабораторного и инструментального обследования больных согласно системе диагностических критериев Американской ревматологической ассоциации, предложенной в 2010 г. (ACR / EULAR). Выраженность анемии оценивали по уровню гемоглобина и количеству эритроцитов в крови обследуемых. Антитела к СОД, ГР определяли непрямым твердофазным иммуноферментным методом с использованием иммобилизованных гранулированных антигенных препаратов с магнитными свойствами [7], концентрацию антител выражали в единицах оптической плотности (е.о.п). Статистическую обработку результатов проводили с использованием программных пакетов Statistica 6.0, Excel 5.0, Statgraphics 3.0, SPSS 12.0. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

В качестве антигенов использовали коммерческие отечественные препараты: СОД из эритроцитов человека (активность 30 Ед/мг) в рабочем разведении по белку – 100 мкг/мл; ГР (активность 340 Ед/мг) – 200 мкг/мл по белку; КАТ (активность 380 Ед/мг) – с концентрацией 1,4 мкг/мл по белку. Учитывая достаточную относительную молекулярную массу ГР и КАТ, иммобилизацию проводили методом эмульсионной

полимеризации в модификации И.П. Гонтьаря с соавт. (1990) в потоке газообразного азота с включением магнитного материала<sup>1</sup>. В связи с небольшой относительной молекулярной массой эритроцитарной СОД фиксацию фермента проводили путем пришивки его молекулы глутаровым альдегидом к инертной полиакриламидной грануле, содержащей магнитный материал. «Чистые» антитела к ферментам получали с помощью соответствующего антигенного иммуносорбента.

Источником специфических иммуноглобулинов служили сыворотки больных РА с высоким титром антител (экстинция  $> 0,2$ ). После инкубации антигенного иммуносорбента и растворимой формы фермента с полученными антителами был проведен анализ изменения активности фермента. Активность СОД определяли по методу С. Чевари и соавт. (1985) [8], а активность ГР по методу Hosoda и Nakamura, описанному М.А. Шифриным (1977) [9].

### Результаты и обсуждение

Определяя ферментативную активность иммобилизованной формы СОД после предварительного взаимодействия с чистыми антителами к СОД, было обнаружено статистически значимое снижение активности фермента на 99% по сравнению с контролем. Это происходит, очевидно, вследствие блокирования антителами активного центра фермента являющегося одновременно и антигенной детерминантой. При определении активности растворимой формы СОД после взаимодействия со специфическими антителами выявлено снижение активности фермента на 65%. Полученные результаты показывают, что растворимая форма СОД после взаимодействия со специфическими антителами сохраняет более высокую активность фермента, чем при его иммобилизации. Это объясняется вероятно тем, что при образовании комплекса антиген – СОД-антитело проявляется СОД-активность, свойственная, по данным литературы, иммунному комплексу [10]. Поэтому было решено определять возможную активность СОД-ЦИК именно в плазме больных РА. Сохранение активности растворимой формы КАТ после взаимодействия со специфическими АТ, может быть объяснено известным фактом неполного совпадения антигенного и активного центров изучаемого фермента, что позволяет последнему в фермент-

<sup>1</sup> Гонтьарь И.П., Зборовский А.Б., Левкин С.В., Сычева Г.Ф. Способ получения магнитных полиакриламидных гранул. Патент на изобретение РФ № 1582657-1993г.

Содержание АТ к СОД, ГР, КАТ у больных РА с различным уровнем Нв.

Контингент обследуемых	N	Антитела к СОД	Антитела к ГР	Антитела к КАТ
Здоровые	30	0,060	0,057	6,72±0,32
Больные РА без анемии	67	0,112±0,021**	0,101±0,048**	10,42±0,63*
Больные РА с 90г/л<Нв<115г/л	21	0,179±0,028***	0,150±0,063***	13,86±1,03**
Больные РА с Нв<90г/л	16	0,229±0,051***	0,210±0,047***	15,64±1,80***

Примечание. \*\*\* –  $p < 0,001$ , \*\* –  $p < 0,01$ , \* –  $p < 0,05$ .

антиферментном комплексе оставаться доступным для низкомолекулярного субстрата [11].

В сыворотках больных РА обнаружены повышенные значения уровня антител к СОД ( $0,135 \pm 0,006$ , в контрольной группе (здоровые лица) –  $0,06 \pm 0,004$ ,  $p < 0,001$ ). Выявлена статистически значимая зависимость между уровнем антител к ферментам и активностью заболевания (АТ к СОД при I ст. активности –  $0,102 \pm 0,011$ , при II –  $0,135 \pm 0,006$ , при III –  $0,229 \pm 0,051$ ; АТ к ГР при I ст. активности –  $0,101 \pm 0,01$ , при II –  $0,15 \pm 0,01$ , при III –  $0,21 \pm 0,04$ ; АТ к КАТ при I ст. активности –  $8,86 \pm 0,47$ , при II –  $11,92 \pm 0,53$ , при III –  $14,53 \pm 1,02$ )  $p < 0,001$ . Показатели уровня антител к СОД, ГР и КАТ статистически значимо зависели и от характера течения заболевания.

Отмечается более высокий уровень антител к этим ферментам при быстро прогрессирующем процессе по сравнению с медленно прогрессирующим. Это позволяет рассматривать уровень антител к СОД, ГР и КАТ как критерии тяжести заболевания. (АТ к СОД –  $r = -0,20$ ,  $p = 0,07$ ; АТ к ГР –  $r = -0,20$ ,  $p = 0,07$ ). Об участии антител к ферментам – антиоксидантам в патогенезе анемии у больных РА говорит выявленная статистически значимая обратная корреляционная зависимость между уровнем антител и величиной гемоглобина, а также количеством эритроцитов в крови больных. Содержание антител к антиоксидантным ферментам статистически значимо возрастало по мере падения уровня гемоглобина и числа эритроцитов в крови, то есть выраженности анемии (табл.).

У больных РА отмечается также увеличение выработки АФК, продуктов ПОЛ в мембранах эритроцитов. Активные метаболиты кислорода повреждают клеточную мембрану путем изменения наиболее лабильных компонентов с образованием перекисных соединений. Повреждения мембран снижают продолжительность жизни эритроцитов, усиливая их адгезию к эндотелию.

Одним из звеньев антиоксидантной защиты эритроцитов являются СОД, ГР и КАТ. Поэтому ингибирование ферментов специфическими иммуноглобулинами возможно является одним из факторов, способствующих развитию анемии у больных РА. Об этом говорят и полученные нами данные о снижении уровня гемоглобина, эритроцитов в группах с повышенным содержанием антител к СОД, ГР, КАТ.

В нормальных условиях после взаимодействия иммунных комплексов с рецепторами комплемента, находящимися на мембранах эритроцита утрачивается способность их фиксироваться в тканях организма, а уменьшение количества эритроцитов, наблюдаемое при различных патологических состояниях, может способствовать снижению клиренса ЦИК и отложению их в тканях, приводя к усилению иммунокомплексных повреждений.

### Заключение

Таким образом, антитела к СОД, ГР и КАТ являются одним из патогенетических факторов развития анемии при РА, а динамика нарастания уровня антител может служить критерием тяжести заболевания.

### Литература

1. Фоломеева О.М., Эрдес Ш.Ф., Насонова В.А. Ревматические заболевания у населения Российской Федерации в начале XXI века. *Терапевтический архив*. 2007; 12: 5-12.
2. Bloxham E. Anaemia in rheumatoid arthritis: can we afford to ignore it? *Postgrad Med J*. 2011; 87: 596-4.
3. Ватулин Н.Т., Смирнова А.С., Калинин Н.В., Шевелев А.Н. Анемия у больных РА: особенности патогенеза, диагностики и лечения. *РМЖ*. 2013; 21: 1069.
4. Blake D.R., Hall N.D., Bacon P.A., Dieppe P.A., Halliwell B, Gutteridge J.M. The importance of iron in rheumatoid disease. *Lancet*. 1981; 2: 1142-2.
5. Носков С.М., Козлов Г.С., Широкова Л.Ю. Своднорадикальные реакции при ревматоидном артрите. *Ревматология*. 1988; (4): 72-4.

6. Weijer C. Bioethics for clinicians: 10 Research ethics. *CMAJ*. 1997; 156: 1153-7.
7. Гонтарь И.П., Сычева Г.Ф., Александров А.В., Шилова Л.Н., Симакова Е.С., Емельянов Н.Н. и соавт. Эмульсионная полимеризация как метод, модифицирующий ферменты с сохранением биологических свойств их наноструктур. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2010; 12: 715-4.
8. Чевари С., Чаба И., Секей Й. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах. *Лабораторное дело*. 1985; (11): 678-3.
9. Шифрин М.А., Заикин В.Н., Гармаш В.Я. Изменение активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в крови при неспецифических воспалительных заболеваниях легких. *Терапевтический архив*. 1977; 49(12): 50-5.
10. Азаренок К.С., Генералов И.И. Новые функции антител. *Терапевтический архив*. 1990; (5): 149-4.
11. Диксон М., Уэбб Э. *Ферменты*: пер. с англ. М.; Мир. 1982; 2: 515.
4. Blake D.R., Hall N.D., Bacon P.A., Dieppe P.A., Halliwell B., Gutteridge J.M. The importance of iron in rheumatoid disease. *Lancet*. 1981; 2: 1142-2.
5. Noskov S.M., Kozlov G.S., SHirokova L.Yu. Summary radical reactions in rheumatoid arthritis. *Revmatologiya*. 1988; (4): 72-4. (in Russian)
6. Weijer C. Bioethics for clinicians: 10 Research ethics. *CMAJ*. 1997; 156: 1153-7.
7. Gontar' I.P., Sycheva G.F., Aleksandrov A.V., Shilova L.N., Simakova E.S., Emel'yanov N.N. et al. Emulsion polymerization as a method of modifying enzymes preserving the biological properties of their nanostructures. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2010; 12: 715-4. (in Russian)
8. Chevare S., Chaba I., Sekey J. The role of superoxide dismutase in oxidative processes of cells and the method of its determination in biological materials. *Laboratornoe delo*. 1985; (11): 678-3. (in Russian)
9. Shifrin M.A., Zaikin V.N., Garmash V.Ya. Changes in the activity of glutathione peroxidase and glutathione reductase in the blood in non-specific inflammatory lung diseases. *Terapevticheskiy arkhiv*. 1977; 49(12): 50-5. (in Russian)
10. Azarenok K.S., Generalov I.I. New antibody functions. *Terapevticheskiy arkhiv*. 1990; (5): 149-4. (in Russian)
11. Dikson M., Uehbb E. *Enzymes: English lane*. Moscow; Mir. 1982; 2: 515. (in Russian)

### References

1. Folomeeva O.M., Erdes Sh.F., Nasonova V.A. Rheumatic diseases in the population of the Russian Federation at the beginning of the XXI century. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2007; 12: 5-12. (in Russian)
2. Bloxham E. Anaemia in rheumatoid arthritis: can we afford to ignore it. *Postgrad Med J*. 2011; 87: 596-600.
3. Vatutin N.T., Smirnova A.S., Kalinkina N.V., Shevelek A.N. 2. Anemia in patients with rheumatoid arthritis: specifics of its

### Сведения об авторах:

**Гонтарь Илья Петрович**, доктор мед. наук, проф., зав. лаб. клинической иммунологии ФГБНУ «НИИ клинической и экспериментальной ревматологии им. А.Б. Зборовского». Волгоград, e-mail: i.p.gontar@mail.ru;

**Емельянова Ольга Ивановна**, вед. науч. сотр. ФГБНУ «НИИ клинической и экспериментальной ревматологии им. А.Б. Зборовского», e-mail: emelyanova.vlg@mail.ru;

**Русанова Ольга Александровна**, мл. науч. сотр. ФГБНУ «НИИ клинической и экспериментальной ревматологии им. А.Б. Зборовского», e-mail: olga-rusanova28@rambler.ru;

**Маслакова Лариса Александровна**, вед. науч. сотр. ФГБНУ «НИИ клинической и экспериментальной ревматологии им. А.Б. Зборовского», e-mail: lar\_mas73@mail.ru;

**Зборовская Ирина Александровна**, директор ФГБНУ «НИИ клинической и экспериментальной ревматологии им. А.Б. Зборовского», доктор мед. наук, проф., e-mail: nauka@pebma.ru;

**Шилова Людмила Николаевна**, доктор мед. наук, зав. каф. госпитальной терапии Волгоградского государственного медицинского университета, e-mail: nauka@pebma.ru;

### Вклад авторов в подготовку материалов и текста:

Гонтарь И.П. – 40%,  
 Емельянова О.И. – 30%,  
 Русанова О.А. – 15%,  
 Маслакова Л.А. – 5%,  
 Зборовская И.А. – 5%,  
 Шилова Л.Н. – 5%.