

АНТИТЕЛА К КАРДИОЛИПИНУ В ЭЛЮАТАХ КОЖИ И МЫШЦЫ У БОЛЬНЫХ ПЕРВИЧНЫМ И ВТОРИЧНЫМ АНТИФОСФОЛИПИДНЫМ СИНДРОМОМ

З.С.Алекберова, Я.Забек¹, Т.М. Решетняк, Б. Войцеховска¹, С.Г. Раденска-Лоповок, В.А.Насонова
ГУ Институт ревматологии РАМН, Москва,
Институт ревматологии, Варшава¹

Резюме

Цель. Определить наличие аКЛ, антител к β_2 -ГП I, фракции комплемента C3 и C4 в составе иммунных комплексов, в том числе содержащих аКЛ в элюатах кожи и мышц больных СКВ и АФС.

Материал и методы. У 7 больных, 6 из которых – с тромботическими осложнениями (6 жен. и 1 муж.), 2 с ПАФС, 3-х с СКВ+ АФС и у 2-х с СКВ, была проведена биопсия кожно-мышечного лоскута. Размеры биоптатов равнялись 1,5 x 0,5 см и 0,5x0,5 см соответственно. Из-за малых размеров биоптатов применение традиционных методов дробления тканей, таких как острая гомогенизация в гомогенаторах с растиркой и последующим процессом замораживания-размораживания, сопровождающегося большой потерей белка, делало невозможным серологический анализ тканей. Использование метода кислых элюатов Т.Е.W.Feltkamp и J.H.Boode в собственной модификации позволило обеспечить минимальные потери тканевого белка и дало возможность серологического исследования тканей.

Результаты. У всех больных в сыворотке крови выявлялись аФЛ: у 3-х IgG-аКЛ и у 5 – сочетание IgG и IgM- аКЛ. В 5 из 7 элюатов выявлялись IgG-аКЛ, превышавшие значения 0,109 ед.ОП., в некоторых обнаруживались комплекс комплемента C3 и C4 и различные белковые продукты, среди которых преобладали иммуноглобулины. Антитела к β_2 -ГП I отсутствовали.

Заключение. Впервые показано наличие в тканях больных АФС аКЛ, что представляет особый интерес при изучении морфогенеза местных тканевых нарушений с участием иммунных комплексов, содержащих аКЛ.

Ключевые слова: антифосфолипидный синдром, антифосфолипидные антитела, системная красная волчанка, элюаты биоптатов кожи и мышцы

Наличие антител к фосфолипидам (аФЛ) в крови ассоциируется с определенным клиническим симптомокомплексом – антифосфолипидным синдромом (АФС) [1,2,3,4], основными проявлениями которого являются рецидивирующие артериальные и/или венозные тромбозы, акушерская патология, тромбоцитопения [5,6,7]. Спектр клинических проявлений, связанных с окклюзией сосудов различной локализации и калибра, довольно широк и во многом зависит от свойств органов или тканей, вовлеченных в процесс окклюзии. Другими признаками АФС являются сетчатое лицевое, гемолитическая анемия, патология клапанов сердца, язвы на нижних конечностях, неврологические нарушения, артериальная гипертензия.

Предполагается, что важную роль в процессе взаимодействия аФЛ и эндотелиальных клеток (ЭК) играет плазменный белок β_2 -гликопротеин I (β_2 -ГП I) [7,8]. В настоящее время получены данные о том, что антитела, присутствующие в сыворотке больных АФС, на самом деле распознают антигенные детерминанты не кардиолипина, а конформационных эпитопов, формирующихся в процессе взаимодействия β_2 -ГП I или реже других плазменных белков крови с кардиолипином. Этот эпитоп может экспрессироваться в молекуле кардиолипина или, что более вероятно, в молекуле β_2 -ГП I [7,9]. Часто в тканях больных АФС при гистологическом исследовании имеют место изменения, напоминающие васкулит [10], однако остается не ясным, каким образом аФЛ вызывают нарушения в системе свертывания крови и повреждения тканей различных органов. В этой связи уместно привести гипотезу о механизме развития поражения клапанов сердца при АФС, согласно ко-

торой аФЛ активируют ЭК и тромбоциты [11,12], при этом не исключается возможность иммунокомплексного повреждения эндотелия сосудов и эндокарда [13,14]. На основании гистохимических исследований сердечных клапанов, полученных на аутопсии и при операциях протезирования клапанов у больных АФС, L. Ziporen и соавт. [14] предположили патогенетическое значение аФЛ в повреждении клапанного аппарата сердца, выявив лентообразные (ribbon-like) субэндотелиальные депозиты иммуноглобулинов, содержащих компоненты комплемента и антиидиотипические антитела к кардиолипину (аКЛ). Важно, что подобные иммуноморфологические нарушения в клапанах были обнаружены только при АФС и не выявлялись в нормальных клапанах и при других заболеваниях, ассоциирующихся с поражением клапанного аппарата сердца.

Целью настоящего исследования было определить наличие различных классов аКЛ, антител к β_2 -ГП I, фракции комплемента C3 и C4 в составе иммунных комплексов в элюатах биоптатов кожи и мышцы у больных СКВ с/ без АФС и ПАФС, используя разработанный метод элюации, позволяющий оценить состав антител, находящихся в тканях.

Материал и методы

У 7 больных (6 жен. и 1 муж.): 2-х с первичным АФС (ПАФС), 4-х – с СКВ + АФС и 1-го – с СКВ – была проведена биопсия кожно-мышечного лоскута.

Всем больным в сыворотке крови определяли аКЛ и волчаночный антикоагулянт (ВА). Определение аКЛ проводилось иммуноферментным методом (ИФМ) согласно методике, описанной ранее в ГУ Институт ревматологии РАМН [9]. За верхнюю границу нормы была принята концентрация аКЛ, превышавшая среднее значение данного показателя у доноров на 5 стандартных отклонений (SD) (M+5SD), что

составило 23 GPL для IgG-аКЛ и 26 MPL для IgM-аКЛ. Клинико-иммунологическая характеристика больных на момент проведения биопсии приведена в табл. 1.

Всего было получено 7 фрагментов кожи и мышечной ткани размером 1,5х0,5 см и 0,5х0,5 см соответственно. Из-за малого размера биоптатов применение традиционных методов дробления тканей, таких как острая гомогенизация в гомогенизаторах с растиркой их и с последующим процессом замораживания-размораживания, сопровождающихся большой потерей белка, делает невозможным серологический анализ тканей. Использование метода кислых элюатов T.E.W. Feltkamp и J.H. Boode [15] в собственной модификации позволило выполнить два важных условия: обеспечить минимальные потери тканевого белка и возможность серологического исследования тканей. Методика исследования элюата представлена на рисунке.

СХЕМА ПОЛУЧЕНИЯ ЭЛЮАТОВ ИЗ БИОПТАТОВ КОЖИ И МЫШЦЫ



Белок в элюате-1 после промывки в PBS составил от 0,1 до 0,5 мг/мл, а в элюате-2 (pH=2,5) - от 0,01 до 0,05 мг/мл, что позволило провести их иммунологическое и серологическое исследование методами ELISA и Western - blotting. Определяли белок методом Lowry O.H. с соав. [16], уровни IgG-аКЛ, а также антитела к $\beta 2$ ГП1 ИФМ. Тест-системы фирмы Cogent (Великобритания) в Western - blotting использовали для выявления иммуноглобулинов, определения уровня комплемента и антител к $\beta 2$ ГП1. ЦИК определяли комбинированным методом, описанным ранее [17]. Уровень аКЛ дан в ед. ОП450 nm или в виде отношения активности к количеству белка в данном элюате в мг, как это принято в энзимологии, что лучше показывает соотношение уровня аКЛ к другим белкам в элюатах тканей (табл.2).

Уровни IgG-аКЛ и IgG-анти- $\beta 22$ -ГП1 в тканях определяли ИФМ. Уровень IgG -анти- $\beta 22$ -ГП1 в крови более 0,184 ед. ОП (М + 5SD) считался позитивным, от 0,147 до 0,184 ед. ОП - сомнительными и - до 0,147 ед.ОП. - отрицательными. Положительными для IgG-аКЛ значениями были выше 0,109 ед.ОП (средний уровень у здоровых лиц, определенный ранее, плюс 4 стандартных отклонения), значения от 0,092 ед. ОП до 0,109 ед.ОП считались сомнительными.

Результаты и обсуждение

Как видно из табл. 2, в 5 из 7 элюатов-1 ИФМ выявлялись IgG-аКЛ, превышавшие значения 0,109 ед. ОП. Ни в одном случае в элюатах-2 не были выявлены аКЛ, превышающие значения 0,109 ед. ОП. Однако, ед. ОП измерений аКЛ при ИФМ в элюатах-2 имели такие величины, что мы предположили необходимость повышения концентрации белка тканей в 5 - 10 раз (т.е. до его уровня в элюате-1). В связи с отсутствием возможности увеличения исследуемого материала в элюатах-2 для выявления антител ОП была со-

отнесена к весу белка в мг (отношение активности к количеству белка - в столбце табл. 2 - белок по методу Lowry), что позволило уравнивать концентрацию аКЛ с белковой концентрацией в обоих элюатах. Такой подход к оценке количества белка в тканях позволил соотнести содержание аКЛ в обоих элюатах, причем в 4-х случаях в элюатах-2 оно оказалось значительным. При этом были получены результаты, свидетельствующие о повышении концентрации белка в элюатах-2 в 5-10 раз (т.е. до его уровня в элюатах-1). Подобная методика, описанная нами, позволяет прийти к заключению о наличии в элюатах IgG -анти- $\beta 2$ -ГП1 кожи и мышцы больных с АФС IgG-аКЛ. При этом не были обнаружены. Количественный анализ состава белка методом Western-blotting в элюатах 1 выявил лишь следы иммуноглобулинов G и M, а также C3 и C4 компоненты комплемента.

У всех исследованных нами больных в сыворотке крови выявлялись аФЛ (табл. 1): у 3-х - IgG-аКЛ и у 5 - сочетание IgG- и IgM-аКЛ. Тромботические осложнения имели 6 из 7 пациентов при этом 3 (больные N 4,6,7) из них находились в период острого тромбоза (период времени после эпизода тромбоза не превышал 1 мес.). В элюатах тканей обнаруживались IgG-аКЛ именно у этих трех больных, а также у одной больной (N 5) без клиники тромбоза, но в период обострения СКВ, еще до назначения ей глюкокортикоидов. Последняя, кроме клинических проявлений, соответствующих обострению СКВ, имела выраженные иммунологические нарушения, и по-видимому, выявление аКЛ в тканях в данном случае ассоциировалось с активностью СКВ.

Гистологический анализ биоптатов кожи и мышцы показал наличие деструктивного васкулита в 4-х из 7-и образцов (1- с СКВ, 3 СКВ+АФС). Продуктивный васкулит имел место только у одной больной СКВ (№5). В двух случаях (1- с ПАФС и 1 -СКВ+АФС) отмечались признаки васкулопатии при отсутствии воспалительной инфильтрации в биоптатах тканей. Иммуногистохимическим методом в биоптатах тканей как в стенке сосудов, так и дермо-эпидермальном стыке были обнаружены IgG, IgM, IgA и C3-фракция комплемента.

Отложения иммунных комплексов в дермо-эпидермальном стыке кожи, известное как Lupus band test (LBT), является диагностическим тестом для СКВ. LBT отмечался в нашем исследовании и при ПАФС (больные 2,3), что подтверждает аутоиммунную природу этого синдрома. Этот феномен, вероятно, носит более универсальный характер, чем считали до сих пор. Отрицательный LBT у двух больных СКВ можно объяснить влиянием гормональной терапии, а также минимальной активностью СКВ. Выявление аКЛ в элюатах в различной комбинации с иммуноглобулинами и иммунными комплексами в сосудах биоптатов и позитивный LBT при первичном и вторичном варианте АФС, а также гистологические признаки как васкулита, так и васкулопатии, свидетельствуют об иммунокомплексном характере сосудистых изменений при АФС и о возможной роли аКЛ в патологическом процессе. Следует отметить, что изучение биоптатов кожи и мышцы больных СКВ с/без АФС и ПАФС на наличие в них депозитов различных классов иммуноглобулинов, компонентов комплемента, аКЛ и IgG-анти- $\beta 2$ -ГП1 было предпринято в определенной степени по аналогии с СКВ, при которой много лет обсуждается значимость суб-эпидермальных отложений иммуноглобулинов. Еще более важной представляется расшифровка антительного состава иммунных комплексов. Так например, доказано, что депозиты иммунных комплексов не только в дермо-эпидермальном стыке [18], но и в других тканевых структурах, включая почечные клубочки и капилляры, чаще всего содержат иммуноглобулины и компоненты комплемента [19,20]. Сочетание иммуноглобулинов нескольких классов в дермо-эпидермальном стыке кожи встречается чаще у больных активной СКВ и в случаях выраженности органных поражений. В экстрактах почечной ткани больных СКВ обнаруживаются также антитела к одно- и двуспиральной ДНК и к нуклеопротеину G [20]. Известно и то, что тканевое повреждение при волчаночном нефрите является следствием иммунокомплексного воспаления.

Заклучая, можно предположить, что в генезе тканевого повреждения при как СКВ с/без АФС, так и ПАФС уча-

Таблица 1

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ ВО ВРЕМЯ ВЗЯТИЯ БИОПСИИ КОЖИ И МЫШЦЫ.

	Ф, возраст, (годы) пол	Диагноз	Клинические признаки СКВ	АФЛ-ассоциированные признаки	Иммунологические нарушения	Иммуногистохимия биоптатов
1	М, 22, Ж	СКВ+АФС	Полисерозит, лихорадка, «бабочка»	СЛ, с-м Рейно, тромбоз артерии стопы	АНФ 1/32, а-ДНК- 53, IgG-аКЛ-78, ВА+	Депозиты IgG, IgM в стенке сосудов, LBT+
2	Г, 23, М	ПАФС	-	Рецидив.тромбозы нижней полый вены, ТЭЛА, трикуспид. порок, легочная гипертензия, дигит. некрозы	РФ 1/40, IgG аКЛ- 43, ВА+	Депозиты IgG, C ₃ в стенке сосудов, LBT+
3	Л, 28, Ж	ПАФС		ТФ, язвы ног, СЛ, ПНМК	IgG-аКЛ-86, IgM- аКЛ – 46, ВА+	Депозиты IgG, IgM, C ₃ в стенке сосудов, LBT+
4	Ф, 46, Ж	СКВ+АФС	Артриты, полисерозит, капилляриты, мочевого синдром	ТФ, СЛ, с-м Рейно	РФ 1/40, АНФ 1/64Н, ЛПРВ, ВА+, IgG-аКЛ-56	Депозиты IgG в стенке сосудов
5	Р, 20, Ж	СКВ	Лихорадка, эритема, капилляриты, артриты, полисерозит, . лейкопения, анемия, ТЦП	-	АНФ 1/512, а-ДНК >100, IgG-аКЛ – 120	Депозиты IgG, IgM, C ₃ в стенке сосудов, LBT+
6	Р, 49, Ж	СКВ+АФС	Артриты, полисерозит, капилляриты, анемия, лейкопения	ТФ, СЛ, с-м Рейно	АНФ 1/128, IgG- аКЛ – 200, IgM-аКЛ – 98, ВА+, ЛПРВ	Депозиты IgG, C ₃ в стенке сосудов
7	В, 45, Ж	СКВ+АФС	Артриты, нефрит, полисерозит, анемия, ТЦП	Рецидив.НМК, ПНМК, СЛ, ТФ, язвы ног, митр. порок, энцефалопатия с когнитивными нарушениями	АНФ 1/512, а-ДНК- 70, IgG-аКЛ 198, ВА+	Депозиты C ₃ , IgM в стенке сосудов, LBT+

Примечание: в клинические признаки внесены проявления, имевшиеся на момент проведения биопсии; В иммунологических нарушениях – те показатели, которые были повышенными.
 Аббревиатура: СЛ- сетчатое ливедо, ТФ- тромбофлебит глубоких вен ног, НМК – нарушение мозгового кровообращения, ПНМК – преходящее нарушение мозгового кровообращения, ЛПРВ – ложноположительная реакция Вассермана
 , ТЦП – тромбоцитопения, LBT – линейные депозиты иммунных комплексов в дермо-эпидермальном стыке биоптата кожи.

Таблица 2

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЭЛЮАТОВ ИЗ БИОПТАТОВ КОЖИ И МЫШЦЫ

	Диагноз	Ткань	Белок в мг по методу О.Н. Lowry ОП _{650 nm} *		Антитела в элюате в ед.ОП				Western-blotting в элюате I		
			Элюат-1*	Элюат-2*	IgG -aКЛ		АНЦА	a-β ₂ -ГПИ	Иммуноглобулины	a-β ₂ -ГПИ	Комплемент C ₃ и C ₄
					Элюат-1*	Элюат-2*					
1	СКВ+АФС	Кожа + мышца	0,55	0,055	0,125	0,043	(-)	(-)	+G	(-)	Следы
2	ПАФС	Кожа + мышца	0,44	0,01	0,048	0,019	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
3	ПАФС	Кожа	0,35	0,01	0,083	0,019	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
4	СКВ+АФС	Кожа + мышца	0,75	0,095	0,163	0,024	(-)	(-)	+G	(-)	Следы
5	СКВ	Кожа + мышца	0,33	0,017	0,17	0,035	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
6	СКВ+АФС	Кожа	0,505	0,075	0,418	0,034	(-)	(-)	+G	(-)	Следы
7	СКВ+АФС	Кожа + мышца	0,515	0,07	0,486	0,026	(-)	(-)	+G	(-)	Следы

* - средняя величина из 3-х измерений, ОП – оптическая плотность

* - средняя величина из 3-х измерений, ОП - оптическая плотность

ствуют не только ранее известные антитела, но и аФЛ. В то же время при ПАФС выявление иммунных комплексов и фракции комплемента подтверждает иммунные механизмы повреждения тканей. Обнаружение аКЛ в элюатах из биоптатов тканей при АФС является важным этапом изучения местных механизмов повреждения, индуцированного им-

мунными комплексами, содержащими аКЛ. Представляется, что дальнейшие исследования биопсийного материала различных органов послужат основанием для выработки усовершенствованных диагностических и терапевтических методик при АФС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hughes G.R.V. Thrombosis, abortion, cerebral disease and the "lupus anticoagulant". *Brit. Med. J.*, 1983, 287, 1088-1089
2. Hughes G.R.V., Harris E.N., Charavi A.E. The anticardiolipin syndrome. *J.Rheumatol.*, 1986, 13, 486-489
3. Asherson R.A., Rhamashta M.A., Ordi-Ros J. et al. The "primary" antiphospholipid syndrome: major clinical and serological features. *Medicine (Baltimore)*, 1989, 68, 366-374
4. Alarcon-Segovia D., Deleze M., Oria C.V., Sanchez-Guerrero J. et al. Antiphospholipid antibodies and antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus. *Medicine*, 1989, 68, 353-365
5. Насонов Е.Л. Антифосфолипидный синдром: клиническая и иммунологическая характеристика. *Клин.мед.*, 1989, 1, 5-13
6. Wilson W.A., Gharavi A.E., Koike T., Lockshin M.D., et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthr. Rheum.*, 1999, 42, 1309-1311
7. Насонов Е.Л. Патогенетические механизмы антифосфолипидного синдрома. В книге "Антифосфолипидный синдром" М., Литтера, 2004, 73-109
8. Насонов Е.Л., Баранов А.А., Шилкина Н.П., Алекберова З.С. Патология сосудов при антифосфолипидном синдроме (клиника, диагностика, лечение). Москва-Ярославль. 1995, 161
9. Насонов Е.Л., Алекберова З.С., Александрова Л.З., и соавт. Антитела к кардиолипину: метод определения и клиническое значение. *Клин.мед.*, 1987, 11, 100-104
10. Алекберова З.С., Решетняк Т.М., Раденска-Лоповок С.Г., и соавт. Васкулопатия у больных системной красной волчанкой с антифосфолипидным синдромом. *Тер.архив*, 1995, 5, 41-44
11. Afek A., Shoenfeld Y., Manor R. et al. Increased endothelial cell expression of alpha3beta1 integrin in cardiac valvulopathy in the primary (Hughes) and second aryantiphospholipid syndrome. *Lupus*, 1999, 8, 502-507
12. Cervera R. Recent advances in antiphospholipid antibody-related valvulopathies. *J.Autoimmun.*, 2000, 15, 123-125
13. Amital H., Langevitz P., Levy Y., Afek A. et al. Valvular deposition of antiphospholipid antibodies in the antiphospholipid syndrome: A clue to the origin of the disease. *Clin.Exp.Rheumatol.*, 1999, 17, 99-102
14. Ziporen L., Golberg Arod M. et al. Libman-Sacks endocarditis in the antiphospholipid syndrome: immunopathologic findings in deformed heart valve. *Lupus*, 1996, 5, 196-205
15. Feltkamp T.E.W., Boode J.H.: Elution of autoantibodies from biopsy tissue. *J. Clin. Pathol.*, 1970, 23, 629-631
16. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265
17. Zabek J., Radenska S., Reshetniak T. et al. The presence of anti-cardiolipin antibodies in eluates from skin and skin-muscle biopsies in the group of SLE, primary and secondary antiphospholipid syndrome. *Reumatologia (Pol.)*, 2000, 38, 8-10
18. Dahl M.V. Usefulness of direct immunofluorescence in patients with lupus erythematosus. *Arch.Dermatol.*, 1983, 119, 1010-1017
19. Koffer D., Schur P.H., Kunkel H.G. Immunological studies concerning the nephritis of SLE. *J.Exp. Med.*, 1967, 126, 607
20. Davis B.M., Gilliam J.N. Prognostic significance of subepidermal immune deposits in uninvolved skin of patients with systemic lupus erythematosus: 10-year longitudinal study. *J.Invest.Dermatol.*, 1984, 83, 242-247

Поступила 20.08.04

Abstract

Z.S. Alekberova, Y. Zabek, T.M. Reshetnyak, B. Voycehovska, S.G. Radenska-Lopovok, V.A. Nasonova
Anticardiolipine antibodies in skin and muscle eluates of pts with primary and secondary antiphospholipid syndrome.

Objective. To detect anticardiolipin antibodies (ACA), anti- β 2-GPI antibodies, C3 and C4 complement components in immune complexes including those containing ACA in skin and muscle eluates of pts with systemic lupus erythematosus (SLE) and antiphospholipid syndrome (APS).

Material and methods. In 7 pts (6 female and 1 male, 2 with primary APS, 3 with SLE+APS and 2 with SLE) skin and muscle biopsies were taken, 6 from 7 pts had thrombotic complications. Eluates were obtained from frozen skin and skeletal muscle biopsies (size was 1,5x0,5 and 0,5x0,5 respectively). Because of small size of biopsies it was not possible to use traditional methods of tissue pouncing such as sharp homogenization of tissues in homogenizers with pulverizing and subsequent process of freezing-unfreezing which lead to large protein loss and make impossible serological tissue analysis. Application of acid eluates method by T.E.W. Feltkamp and J.H. Boode of own modification allowed to minimize tissue protein loss and perform serological tissue analysis.

Results. Serum of all 7 pts contained antiphospholipid antibodies - IgG-ACA in 3, combination of IgG- and IgM-ACA in 5. In 5 from 7 eluates IgG ACA exceeded 0,109 OO units were revealed. They contained C3, C4 and different protein products mostly immunoglobulines. Anti- β 2GPI antibodies were absent.

Conclusion. For the first time presence of ACA in tissues of APS pts was showed which may be of particular interest in studying morphogenesis of local tissue disturbances with participation of immune complexes containing ACA.

Key words: antiphospholipid syndrome, antiphospholipid antibodies, systemic lupus erythematosus, skin and muscles biopsies eluates