

Комплексная оценка содержания в сыворотке крови естественных аутоантител у лиц с алкогольной зависимостью

ПАНЧЕНКО Л.Ф.
ТЕРЕБИЛИНА Н.Н.
НАУМОВА Т.А.
БАРОНЕЦ В.Ю.
СИМОНОВА А.В.
СИМОНОВ Д.В.
КАРАБИНЕНКО А.А.
ПОЛЕТАЕВ А.Б.

д.м.н., академик РАМН, рук. лаборатории биохимии ФГУ ННЦ наркологии Росздрава, Москва
к.м.н., в.н.с. лаборатории биохимии ФГУ ННЦ наркологии Росздрава, Москва
к.б.н., в.н.с. лаборатории биохимии ФГУ ННЦ наркологии Росздрава, Москва
с.н.с. лаборатории биохимии ФГУ ННЦ наркологии Росздрава, Москва
д.м.н., профессор лаборатории клинической иммунологии ГНЦ Института иммунологии ФМБА России
н.с. лаборатории клинической иммунологии ГНЦ Института иммунологии ФМБА России
д.м.н., профессор кафедры госпитальной терапии №2 лечебного факультета ГОУ ВПО РГМУ Росздрава, Москва
д.м.н., профессор, научный руководитель Медицинского исследовательского центра «Иммунокулус», Москва

Общий уровень активности иммунной системы у 80% пациентов с алкогольной зависимостью (АЗ) отличался от физиологических значений, причем в части случаев отмечалось поликлональная иммуноактивация, а в части — патологическая иммуносупрессия. По аномалиям содержания в сыворотке крови отдельных аутоантител (ауто-АТ), отражающих состояния разных органов и систем, у 84% пациентов отмечали изменения инсулиновых рецепторов, у 70% обследованных — признаки нарушений в ЦНС (аксонопатии, глиоз и др.). Также в 70% случаев выявлены изменения в сосудистой системе (васкулиты и/или тромбоцитопатии). У половины обследованных (52%) отмечали изменения надпочечников, в 40% случаев — дистрофические изменения в миокарде. Признаки активных воспалительно-деструктивных процессов в печени были выявлены у 40% пациентов. У 8—30% пациентов отмечали признаки изменений других органов (поджелудочной железы, желудка, кишечника, почек, легких, щитовидной железы). Таким образом, была наглядно показана возможность выявления определенных органных нарушений (в том числе и не диагностированных ранее) с помощью анализа содержания в сыворотке крови множества ауто-АТ разной специфичности. Получение соответствующей информации, очевидно, будет способствовать не только углубленному пониманию патохимических и патофизиологических перестроек, характерных для организма лиц с АЗ, но и позволит более обоснованно и эффективно подойти к выбору тактики их лечения.

Ключевые слова: алкогольная зависимость, естественные антитела, органопатология при алкоголизме

Введение

Известно, что у лиц со сформированной алкогольной зависимостью существенно меняются особенности общего метаболизма и нарушаются функции многих органов и систем, что ведет к преждевременному «износу» организма. В этих условиях важное значение имеет своевременное назначение корректирующих и профилактических мероприятий. Однако назначение индивидуально обоснованных корректирующих мероприятий возможно лишь при условии максимально раннего выявления начинающихся патологических изменений в тех или иных структурах организма. Это ставит вопрос о необходимости разработки простых и информативных методов скринингового исследования организма, позволяющих рано, по возможности на начальных (доклинических) этапах, выявлять органопатологические изменения у конкретного обследуемого.

Согласно концепции "Иммунокулуса" [2], иммунная система содержит образ индивидуального организма, отражающий особенности его молекулярного (антигенного) состава. Предполагается, что иммунная система осуществляет постоянный антигенный скрининг состава организма и его сравнение с исходным обра-

зом-матрицей и, при выявлении расхождений, запускает работу механизмов коррекции. Таким образом, иммунная система играет роль своеобразного гироскопа, сервомеханизма, участвующего в поддержании общего метаболического гомеостаза [2]. Материальной основой, обеспечивающей создание и сохранение образа-иммунокулуса, отражающего антигенно-метаболическое состояние организма, является общеорганизменная система естественных ауто-АТ. Ауто-АТ, направленные к самым разным антигенам собственного организма, синтезируются в организме человека на протяжении всей индивидуальной жизни. У здоровых лиц содержание в сыворотке крови ауто-АТ конкретной органный и тканевой специфичности примерно одинаково. Это определяется тем, что уровни синтеза любых ауто-АТ регулируются по принципу обратной связи уровнями продукции и поступления в межклеточные пространства и общий кровоток соответствующих ауто-АТ [1]. У здоровых лиц уровни продукции большинства ауто-АТ очень близки, а краткосрочные (несколько часов/дней) ситуационно обусловленные изменения обычно не отражаются на сывороточном содержании соответствующих ауто-АТ. В то же время сывороточные концентрации многих ауто-АТ заметно

меняются при развитии множества хронических заболеваний. Соответствующие изменения обусловлены тем, что задолго до клинической манифестации болезни начинаются перманентные изменения уровней продукции определенных антигенов в тех или иных клеточных популяциях и происходит активация апоптоза определенных групп клеток, сопровождающаяся избыточным поступлением клеточных антигенов в межклеточные пространства и кровотоки [2]. Поэтому выявление соответствующих изменений в сывороточном содержании ауто-АТ разной специфичности имеет очевидное клиническое значение. Характерно, что при развитии патологических изменений сдвиги в содержании многих ауто-АТ появляются существенно раньше, чем патологический процесс может быть зарегистрирован с помощью общепринятых инструментальных и лабораторных показателей (УЗИ, КТ, биохимическое исследование крови). Основываясь на динамике изменений сывороточного содержания ауто-АТ, можно оценивать выраженность нарушений в органах, прогнозировать течение заболевания, дифференцированно подбирать терапию и оценивать ее эффективность [2].

Целью нашей работы была оценка сывороточного содержания ряда ауто-АТ класса IgG разной органной специфичности у лиц с АЗ.

Пациенты и методы исследования

Были исследованы сыворотки крови 70 чел. с АЗ, проходивших лечение в ГKB №12 г.Москвы и психиатрической больнице №14 г.Москвы, в том числе 45 мужчин, возраст от 35 до 61 года (в среднем 48 лет) и 25 женщин — возраст от 35 до 55 лет (в среднем 45 лет). До исследования образцы сыворотки крови пациентов хранились не более 3 мес. при -20°C ; образцы размораживались однократно, непосредственно перед исследованием.

Иммуноферментный анализ

В сыворотке крови пациентов определяли содержание ауто-АТ, взаимодействующих со специфическими антигенами печени (HMMР, HeS-08, Hepatic tubulin), почек (KiM-05; KiS-07), желудка (GaM-0,2), кишечника (ItM-0.7), сердца (b1-адренорецепторы), сосудов (ANCA-0,8), тромбоцитов (TrM0.3), щитовидной железы (тироглобулин и рецепторы ТТГ), поджелудочной железы (инсулин/проинсулин), рецепторами инсулина (Ins-Rc), антигенами надпочечников (AdrM-D/C-0), простаты и сперматозоидов (Spr-0.6), нервной системы (S100, GFAP и MBR). Оценивали также содержание ауто-АТ, отражающих общий уровень активности иммунной системы (ауто-АТ к двуспиральной ДНК, 2-гликопротеину и ауто-АТ к Fc-фрагментам иммуноглобулинов, т.е. ревмофактор).

Определение сывороточного содержания ауто-АТ класса IgG 24 разных антигенных специфичностей

выполняли с использованием специализированных диагностических наборов ЭЛИ-Висцero-Тест (производство МИЦ «Иммункулус», Россия), согласно инструкциям изготовителя. Уровень оптической плотности иммуноферментной реакции контрольной сыворотки (КС) с каждым из антигенов принимался за 100%, а интенсивность реакции сывороток пациентов рассчитывали, как описано ранее [5]. Сначала рассчитывали среднюю индивидуальную иммунореактивность исследуемых образцов сыворотки крови с каждым из антигенов в сравнении с реакцией контрольной сыворотки по формулам:

$$\text{СИР} = \frac{R(\text{ag1})}{R(k1)} \cdot 100 \quad \frac{R(\text{ag2})}{R(k2)} \cdot 100 \quad \dots$$

$$\frac{R(\text{ag24})}{R(k24)} \cdot 100 : 24,$$

где:

СИР — средняя индивидуальная иммунореактивность сыворотки индивидуального пациента по отношению ко всем используемым антигенам, выраженная в процентах от средней иммунореактивности контрольной сыворотки с теми же антигенами;

$R(\text{ag1}, 2, \dots 24)$ — реактивность (в единицах оптической плотности) сыворотки исследуемого пациента с антигенами-1, 2, ... 24;

$R(k1, k2, \dots 24)$ — реактивность (в единицах оптической плотности) контрольной сыворотки с антигенами-1, 2, ... 24.

Затем рассчитывали отклонение (в процентах от индивидуального среднего нормализованного уровня реакции) сыворотки исследуемого пациента с каждым из используемых антигенов, используя формулы:

$$R(\text{nrm})\text{ag1} = \frac{OD(\text{ag1})}{OD(k1)} \cdot 100 \quad \text{СИР}$$

$$R(\text{nrm})\text{ag2} = \frac{OD(\text{ag2})}{OD(k2)} \cdot 100 \quad \text{СИР}$$

$$R(\text{nrm})\text{ag24} = \frac{OD(\text{ag24})}{OD(k24)} \cdot 100 \quad \text{СИР},$$

где:

$R(\text{nrm}) \text{ag1, ag2, } \dots \text{ag24}$ — отклонение (в процентах от индивидуального среднего нормализованного уровня реакции) сыворотки исследуемого пациента с каждым из используемых антигенов-1, 2, ... 24;

$OD(\text{ag1, ag2, } \dots \text{ag24})$ — оптическая плотность реакции сыворотки индивидуального пациента с каждым из используемых антигенов-1, 2, ... 24;

$OD(k1, k2, \dots k24)$ — оптическая плотность реакции контрольной сыворотки с каждым из используемых антигенов-1, 2, ... 246.

Для расчетов была использована соответствующая компьютерная программа.

*Интерпретация
данных иммунохимических исследований*

Согласно инструкции к наборам, оптимум значений *среднего индивидуального уровня иммунореактивности* (в сравнении с контролем) у здоровых взрослых лиц находится в диапазоне $-15 \text{ — } +5\%$ от среднего уровня реакции КС с любым из используемых антигенов. Если средний индивидуальный уровень иммунореактивности исследуемой сыворотки превышал $+5\%$ от уровня реакции КС с используемыми антигенами — это рассматривали как указание на поликлональную активацию иммунной системы. Если СИР исследуемой сыворотки был ниже -15% от уровня реакции контрольной сыворотки с используемыми антигенами — это рассматривали как указание на поликлональную иммуносупрессию. Известно, что патологические изменения, происходящие в отдельных органах, отражаются в росте сывороточной концентрации отдельных видов ауто-АТ и росте СИР в реакции с соответствующими антигенами [2]. Избирательный подъем относительной иммунореактивности с теми или иными антигенами выше 20% от индивидуального среднего уровня рассматривали как возможный индикатор имеющихся или формирующихся нарушений в соответствующих органах и системах конкретного пациента.

Статистический анализ полученных результатов проводился методами непараметрической статистики (критерий U Уилкоксона—Манна—Уитни).

Результаты и обсуждение

Как отмечалось выше, в отличие от состояния нормы сывороточные концентрации многих ауто-АТ заметно меняются при развитии множества хронических заболеваний [2]. Эти драматические изменения, которые можно использовать в клинике, обусловлены тем, что задолго до клинической манифестации болезни начинаются перманентные изменения уровней продукции определенных антигенов в тех или иных группах клеток, что ведет к долговременным изменениям сывороточного содержания соответствующих наборов ауто-АТ, весьма специфичных для каждой патологии. Рассмотрим причины, обуславливающие сходство концентраций ауто-АТ в норме у разных лиц и их различия при развитии патологии. Известно, что уровень продукции и сывороточного содержания ауто-АТ любой специфичности по принципу обратных связей регулируется количеством соответствующих аутоантигенов, поступающих в общее русло циркуляции, процессируемых антигенпредставляющими клетками (макрофагами и дендритными клетками) и презентруемых лимфоцитам. Основным источником аутоантигенов, поступающих в кровоток, являются апоптотически отмирающие клетки. Многие (возможно, большая часть) ауто-АТ используются для клиренса организма. Ранее считалось, что клиренс от

продуктов естественного катаболизма осуществляется, в основном, макрофагами. Однако следует учесть, что макрофаги являются, фигурально выражаясь, «слепыми» клетками. Сами по себе они не способны отличить субклеточные частицы или молекулы, подлежащие утилизации, от тех, что надлежит оставить в организме. Макрофаг не в состоянии отличить «стареющий» эритроцит от «нового» или молекулу собственного альбумина от чужеродной молекулы. Поэтому макрофаги поглощают не любые частицы (фагоцитозом) или молекулы (пиноцитозом), но лишь те, которые оказываются «облеплены» антителами, предварительно специфически связавшиеся с данным антигеном. Таким образом, антитела «маркируют» продукты, подлежащие утилизации фагоцитами [2]. Макрофаги же имеют на своей поверхности большое число рецепторов, специфически связывающих антитела за константную Fc-концевую порцию, при условии, что их Fab-структуры (т.е. антигенсвязывающие сайты), ассоциированы с соответствующими корпускулярными или молекулярными антигенами [3]. Таким образом, ауто-АТ выполняют функцию системы наведения макрофагов на цели, которые должны быть утилизированы. Понятно, что чем больше продуктов, подлежащих утилизации, присутствует в организме, тем больше должно быть выработано антител, специфически связывающихся данными продуктами для индукции эффективного макрофагопосредованного клиренса последних.

В нормальных условиях (у здоровых людей) уровни индивидуальных различий интенсивности отмирания (апоптоз) и замещения (репарация) дифференцированных клеток любого органа приблизительно одинаковы. Этим обуславливаются приблизительно одинаковые уровни накопления антигенных продуктов, подлежащих утилизации и, соответственно, определяются примерно одинаковые уровни продукции естественных ауто-АТ соответствующей антигенной специфичности.

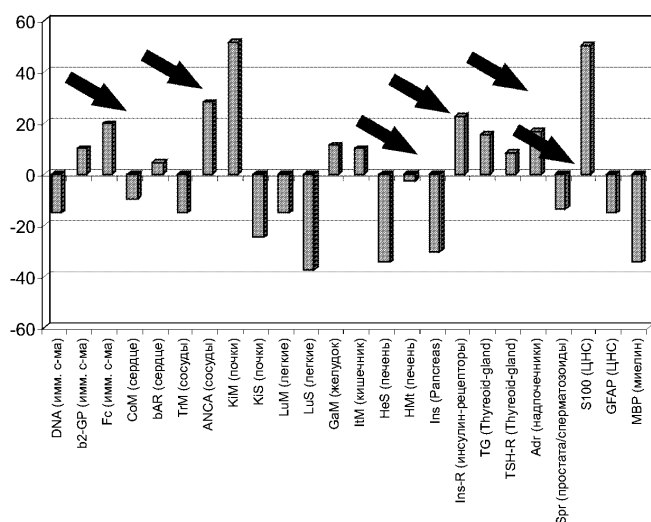
В отличие от этого, развитие любого рода патологических изменений в любом органе почти обязательно сопровождается локальными изменениями интенсивности процессов апоптоза/регенерации/репарации. Это ведет к изменениям поступления и презентации соответствующих органоспецифических аутоантигенов и, по принципу обратных связей, неизбежно сопровождается адаптивной реакцией иммунной системы в виде изменений продукции ауто-АТ соответствующей органной специфичности. Эта физиологическая аутоиммунная реакция направлена, в первую очередь, на оптимизацию клиренса затронутого патологией органа, а также на активацию регенераторных процессов (некоторые ауто-АТ стимулируют тканевый рост и регенерацию [2, 5]).

С учетом сказанного становится понятным, почему анализ количественных изменений в содержании специфических ауто-АТ, может служить своеобраз-

ным «зеркалом», позволяющим судить о начинающихся или уже манифестировавших патологических процессах любой органной локализации.

Рассмотрим наиболее типичные для исследованных пациентов изменения, отражаемые в «зеркале» соответствующих ауто-АТ.

При анализе полученных нами результатов обращает на себя внимание то, что приблизительно для 80% обследованных пациентов, страдающих АЗ, характерны аномалии общего уровня активности аутоиммунной системы. При этом у 48% обследуемых (эта группа включала в себя преимущественно больных с алкогольным циррозом печени) средний индивидуальный уровень иммунореактивности был ниже граничного значения нормы реакции, т.е. почти у половины пациентов отмечалось генерализованное снижение активности аутоиммунной системы. Случаи патологической активации иммунной системы, при которых средний индивидуальный уровень иммунореактивности был выше граничного значения нормы реакции, составляли 32% (в основном, больные с алкогольным гепатитом в стадии обострения). Наконец, нормальный уровень активности иммунной системы был выявлен у 20% обследованных лиц. Таким образом, изменения со стороны иммунной системы можно отнести к наиболее характерным для данного контингента пациентов.



Патологические изменения, происходящие в организме, наиболее информативно отражаются не столько в росте сывороточной концентрации отдельных ауто-АТ, сколько в изменениях относительных соотношений между многими ауто-АТ. Методы группы ЭЛИ-Тест, направленные на одновременную количественную оценку относительных изменений в содержании множества естественных ауто-АТ, позволяют системно оценить такие изменения.

Каждый столбик гистограммы отражает нормализованные отклонения иммунореактивности ауто-АТ определенной специфичности (от индивидуального среднего уровня иммунореактивности данного пациента, выраженные в %). Подъем относительного содержания (иммунореактивности) ауто-АТ определенной органной специфичности выше 20% от индивидуального среднего уровня обследуемого рассматривается как возможный индикатор нарушений в соответствующих органах и системах (показано стрелками):

по оси X — антигены-мишени соответствующих ауто-АТ;

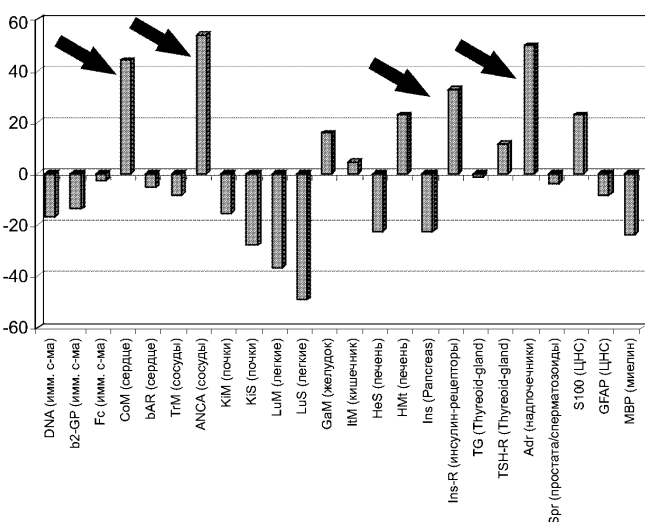
по оси Y — нормализованные отклонения иммунореактивности ауто-АТ соответствующей антигенной специфичности (в процентах от индивидуального среднего, принимаемого за нулевой уровень)

Поскольку одной из важнейших функций иммунной системы является ее участие в процессах клиренса и детоксикации от экзогенных и эндогенных вредных факторов, нарушения общей активности иммунной системы неизбежно ведут к прогрессивному нарушению общего гомеостаза из-за избыточного накопления вредных продуктов, нарушающих общий метаболизм, и последующим полиорганным изменениям. В связи с этим отметим, что у всех обследованных нами лиц (100%) были выявлены те или иные аномалии в содержании естественных ауто-АТ разной специфичности, отражающие патологические изменения со стороны разных органов и систем.

В качестве типичного примера на рисунке представлены результаты, полученные при иммунохимическом исследовании двух пациентов. Стрелками отмечены изменения со стороны маркерных ауто-АТ, отражающие патологические процессы, затрагивающие те или иные морфофункциональные структуры организма человека. На оси абсцисс обозначены антигены-мишени соответствующих ауто-АТ и указаны (в скобках) затрагиваемые органы и системы.

Наиболее часто (у 84% пациентов) можно было отметить признаки имеющегося или формирующегося инсулиннезависимого диабета 2-го типа.

Приблизительно у 70% обследованных были обнаружены изменения, характерные для имеющихся или формирующихся нарушений со стороны ЦНС по типу



аксонопатий, глиоза, изменений в системе белков S100 (наиболее часто), регулирующих, в частности, состояние эмоционально-мотивационной сферы [4].

Также примерно в 70% случаев отмечались изменения, указывающие на нарушения в сосудистой системе (по типу васкулитов и/или тромбоцитопатий). Не исключено, что сосудистые нарушения могли лежать в основе части нарушений, затрагивающих деятельность сердца и ЦНС.

Более чем у половины обследованных (52%) отмечались изменения со стороны надпочечников.

В 40% случаев наблюдались признаки дистрофических изменений в миокарде.

До 30% пациентов имели признаки изменений со стороны других органов (поджелудочной железы, желудка, кишечника, почек, легких, щитовидной железы).

Несмотря на то, что все пациенты имели диагноз *хронический гепатит* или *цирроз печени*, изменения содержания в сыворотке крови «гепатотропных» аутоантител, отражающие активные воспалительно-деструктивные процессы в печени, были выявлены менее чем у половины (40%) пациентов. Возможно, это связано со значительным снижением интенсивности

апоптоза гепатоцитов в силу выраженного уменьшения их общей численности. Понятно, что при длительно развивающихся патологических процессах в паренхиме печени происходит постепенное замещение весьма значительной части специализированных клеток соединительнотканнвыми элементами.

Безусловно, выявленные в нашей работе закономерности нуждаются в дополнительном изучении и осмыслении, в том числе в плане выработки наиболее эффективной, патогенетически обоснованной тактики лечения и реабилитации соответствующих пациентов.

Список литературы

1. Ковалев И.Е., Полевая О.Ю. Биохимические основы иммунитета к низкомолекулярным химическим соединениям. — М.: Наука, 1985.
2. Поletaev A.B. Иммунофизиология и иммунопатология. — М.: Медицинское информационное агентство, 2008. — 207 с.
3. Хайтов Р.М., Игнатова Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология. — М.: Медицина, 2000.
4. Штарк М.Б. Мозгоспецифические белки (антигены) и функции нейрона. — М.: Медицина, 1985.
5. Poletaev A.B., Abrosimova A.A., Sokolov M.A., Gekht A.B., Alferova V.V., Gusev E.I., Nikolaeva T.Ya., Selmi C. Dialectics and Implications of Natural Neurotropic Autoantibodies in Neurological Disease and Rehabilitation // Clinical and Developmental Immunology. — 2004. — Vol. 11, №2. — P. 151—156.

SERUM CONTENT OF AUROANTIBODIES WITH DIFFERENT SPECIFICITY IN PERSONS SUFFERED BY ALCOHOL ADDICTION

PANCHENKO L.F.

Dr. Med. Sci., Professor, Academician RAMS, Head of laboratory of biochemistry of National Research Center for Addictions, Moscow

NAUMOVA T.A.

Cand. Biol. Sci., Leading Researcher of laboratory of biochemistry of National Research Center for Addictions, Moscow

TEREBILINA N.N.

Cand. med. sci., Leading Researcher of laboratory of biochemistry of National Research Center for Addictions, Moscow

BARONETZ V.Yu.

Senior Researcher of laboratory of biochemistry of National Research Center for Addictions, Moscow

SIMONOVA A.V.

Dr. Med. Sci., Professor of laboratory of clinical immunology of Research Center Federal Medical-Biological Agency Institute of Immunology, Russia, Moscow

SIMONOV D.V.

Scientific Researcher of laboratory of clinical immunology of Research Center Federal Medical-Biological Agency Institute of Immunology, Russia, Moscow

KARABINENKO A.A.

Dr. Med. Sci., Professor of Department of hospital therapy of Russian State Medical University, Moscow

POLETAEV A.B.

Dr. Med. Sci., Professor, Head of Research Dept., Med. Res. Ctr. «Immunculus», Moscow

General activity of the immune system was deviated in 80% of investigated patients suffered with alcohol addiction (in form of polyclonal immune suppression or immune activation). Besides systemic changes, anomalies in the serum contents of separate marker antibodies of IgG class has indicates for specific changes in different organs and systems of investigated patients. Deviations in peripheral insulin receptors were revealed in 84% of cases, deviations in the nervous system were revealed in 70%, vascular deviations were found in 70%, changes in adrenals were revealed in 52%, myocardial dystrophy — in 40%, active inflammatory or destructive changes in liver — in 40%. Other organs (pancreas, stomach, intestine, kidneys, lungs, thyroid gland) were suffered in 8—30% of cases. Data obtained does indicate clearly for possibility to reveal different organ-specific changes by specialized immunochemical methods directed to simultaneous evaluation of serum content of multiple natural autoantibodies with different antigen specificity. According information may be used for optimization of treatment of patients as well as for better understanding of pathochemical and pathophysiological changes in organism related to alcohol addiction.