

На правах рукописи

СИМАКОВА Екатерина Станиславовна

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ
ПРИМЕНЕНИЯ ИММОБИЛИЗИРОВАННОЙ
ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕАЗЫ I ТИПА
ПРИ ЛЕЧЕНИИ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКИ**

14.01.22 – ревматология

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Волгоград – 2011

Работа выполнена в ГОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития России» и Учреждении Российской академии медицинских наук «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии РАМН»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор ГОНТАРЬ Илья Петрович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор ЧИЖОВ Петр Александрович

доктор медицинских наук, профессор КУЛИЧЕНКО

Людмила Леонидовна

Ведущая организация:

ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздравсоцразвития России».

Защита состоится «___» октября 2011 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 208.008.02 при ГОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития России» по адресу: 400131, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития России».

Автореферат разослан «___» _____ 2011 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 208.008.02
доктор медицинских наук, профессор

А.Р. Бабаева

Актуальность проблемы

Несмотря на достигнутые к настоящему времени успехи, лечение больных системной красной волчанкой (СКВ) остается одной из наиболее сложных проблем клинической ревматологии. Объективной причиной такой ситуации является выраженный полиморфизм клинической картины заболевания с нередким вовлечением в патологический процесс внутренних органов и, как следствие, развитием хронической дисфункции последних, а также жизнеугрожающих urgentных состояний. При разработке тактики ведения больных СКВ весьма значительные ограничения налагает несовершенство используемых методов лечения.

Основу общепринятого алгоритма лечения СКВ составляет неизбежная медикаментозная иммуносупрессия, создаваемая с помощью глюкокортикостероидов, цитостатических препаратов (азатиоприн, циклофосфамид) и производных 4-аминохинолина [Иванова М.М., 2004; Зоткин Е.Г., 2009]. Потенцирование эффекта иммунодепрессантов может быть достигнуто посредством плазмафереза или других экстракорпоральных процедур [Соловьев С.К., Асеева Е.А., 2007; Gaubitz M., Schneider K.M., 2003; Yamaji K. et al., 2008]. Все перечисленные препараты и методы были введены в клиническую практику на рубеже 70-х – 80-х гг. XX века и применяются до настоящего времени. Основным недостатком глюкокортикоидов и традиционных цитостатических иммунодепрессантов является высокий риск интеркуррентных инфекций, остеопороза, асептического некроза костных структур, гемоцитопений, возникновение неходжкинских лимфом и геморрагического цистита [Bertsias G. et al., 2008]. Ограниченный терапевтический диапазон указанных препаратов определяется дозозависимостью как лечебного эффекта, так и риска осложнений; данная закономерность справедлива и для комбинации иммунодепрессантов [Hoes J.N., 2007]. Вследствие этого попытки полного подавления активности СКВ с помощью традиционных методов, как правило, не приводят к значительному улучшению исходов лечения.

Как традиционные, так и инновационные методы лечения СКВ направлены в основном на снижение влияния патогенных аутоантител, которое осуществляется путем либо подавления их синтеза, либо удаления преформированных иммуноглобулинов из кровотока. Этот подход является общим для многих аутоиммунных заболеваний, при которых преобладает активация гуморального звена, поскольку возможность влияния на второй компонент аутоиммунной реакции, аутоантигены, как правило, крайне ограничена. При СКВ ведущие аутоантигены-внеклеточные дезоксирибонуклеопротеиды ядерного происхождения – являются лишь продуктом распада клеток и не несут какой-либо значимой физиологической функции [Pisetsky D.S., Jiang N., 2006]. Данное обстоятельство предоставляет возможность альтернативного способа влияния на патогенность системы ДНК – антитела к двуспиральной ДНК (анти-дсДНК) путем элиминации аутоантигена, и, тем самым, преодоления вышеупомянутых ограничений при лечении СКВ. Удобным инстру-

ментом такого воздействия может стать дезоксирибонуклеаза I типа (ДНКазы I) – фермент, одной из физиологических функций которого является разрушение ДНК и нуклеопротеидов [Narirei M. et al., 2005; 2006].

Представляется актуальным оценить эффективность и переносимость ДНКазы I при лечении СКВ, используя как изолированную кровь больных СКВ *in vitro*, так и экспериментальную модель данного заболевания на лабораторных животных. Наиболее целесообразной представляется реализация эффекта фермента путем экстракорпоральной перфузии крови через иммобилизованную форму ДНКазы I. С учетом отсутствия в настоящее время валидных моделей СКВ, пригодных для экстракорпоральных процедур, необходимо модифицировать существующие способы воспроизведения нарушений катаболизма ДНК применительно к лабораторным животным.

Для уменьшения высвобождения в кровотоки патогенных анти-дсДНК, содержащихся в иммунных комплексах, при перфузии через иммобилизованную ДНКазу I *in vivo* целесообразно применение в качестве вспомогательного компонента иммобилизованного C1q-компонента комплемента. Помимо потенцирования эффекта ДНКазы I в отношении высокомолекулярных ЦИК, C1q является лигандом агрегированных IgG и IgM и способен фиксировать промежуточные продукты ферментативного распада – среднемолекулярные ЦИК, снижая тем самым выброс свободных анти-дсДНК в кровеносное русло [Walport M.J., 2002; Gaipf U.S. et al., 2004; Sontheimer R.D. et al., 2005]. Высокая молекулярная масса C1q (около 460 кДа), а также использование метода эмульсионной полимеризации для получения МГ [Гонтарь И.П., 2006] значительно уменьшают риск диссоциации иммобилизованного вещества, что обеспечивает эффективность сорбции ИК [Kilgallon W. et al., 1982]. Согласно ранее опубликованным сообщениям, экстракорпоральная перфузия плазмы крови больных СКВ через иммобилизованный на полиакриламидных и полигидроксиметакрилатных немагнитных гранулах C1q *in vitro* и *in vivo* позволяла эффективно сорбировать значительную долю ЦИК [Bratt T., Ohlson S., 1988; Niepe F. et al., 1990; Berner V. et al., 2001; Pfueller B. et al., 2001], что способствовало клинически значимой редукции активности СКВ, кожных, суставных и почечных проявлений заболевания, а также снижению СОЭ, СРБ, концентраций анти-дсДНК, антител к C1q и фибриногена. Существенных побочных эффектов зафиксировано не было. Исходя из этих данных, использование иммобилизованного C1q в сочетании с ДНКазой I-содержащими МГ может быть достаточно эффективным и безопасным при перфузии *in vivo* на экспериментальной модели.

Цель исследования

Цель данного исследования – усовершенствование лечения больных системной красной волчанкой путем разработки нового метода экстракорпоральной перфузии крови через магнитоуправляемые гранулы с иммобилизированной ДНКазой I.

Основные задачи исследования

1. Иммобилизовать ДНКазы I и C1q в составе магнитоуправляемых гранул;
2. Исследовать влияние перфузии изолированной крови больных СКВ через магнитоуправляемые гранулы с иммобилизированной ДНКазой I на концентрацию ДНК, циркулирующих иммунных комплексов, антител к двуспиральной ДНК, форменных элементов и общего белка крови;
3. Выявить наличие статистических взаимосвязей между клиническими особенностями СКВ и выраженностью эффекта перфузии изолированной крови пациентов через ДНКазу I-содержащие магнитоуправляемые гранулы, оцениваемого посредством измерения концентраций ДНК, циркулирующих иммунных комплексов, антител к двуспиральной ДНК, а также форменных элементов и общего белка крови;
4. Адаптировать экспериментальную модель нарушения катаболизма нуклеопротеидов при СКВ для исследования экстракорпоральной перфузии крови на крысах. Охарактеризовать валидность модифицированной модели в отношении изучаемых показателей;
5. Оценить воздействие однократной экстракорпоральной перфузии крови *in vivo* через смесь ДНКазы I- и C1q-содержащих магнитоуправляемых гранул на интенсивность фиксации антител к двуспиральной ДНК в почках, плазменную концентрацию ДНК, циркулирующих иммунных комплексов и антител к двуспиральной ДНК по результатам рандомизированного плацебо-контролируемого исследования на экспериментальной модели СКВ;
6. Изучить безопасность рассматриваемого метода лечения в аспекте острой гепато-, нефро- и гематологической токсичности в рамках рандомизированного плацебо-контролируемого исследования на экспериментальной модели СКВ.

Научная и практическая новизна

Впервые продемонстрирована вариабельность эффекта иммобилизированной ДНКазы I на циркулирующие нуклеопротеиды в зависимости от клинических особенностей СКВ. Разработана и валидирована экспериментальная модель нарушений катаболизма ДНК при системной красной волчанке, пригодная для изучения экстракорпоральных методов лечения. Выполнена доклиническая оценка эффективности и переносимости экстракорпоральной перфузии крови *in vivo* через смесь ДНКазы I- и C1q-содержащих магнитоуправляемых гранул в соответствии с требованиями доказательной медицины.

Впервые на экспериментальной модели показана эффективность однократной экстракорпоральной перфузии крови крыс *in vivo* через смесь ДНКаза I- и С1q-содержащих магнитоуправляемых гранул для предупреждения фиксации в почках антител к двуспиральной ДНК, а также уменьшения концентрации циркулирующих нуклеопротеидов. Кроме того, при использовании данного метода лечения не выявлено признаков острой гепато-, нефро- и гематологической токсичности.

Положения, выносимые на защиту

Иммобилизованная на магнитоуправляемых гранулах ДНКаза I способна разрушать циркулирующую ДНК в крови как больных СКВ, так и экспериментальных моделей, воспроизводящих основные нарушения катаболизма нуклеопротеидов при данном заболевании.

Экстракорпоральная перфузия крови крыс *in vivo* через смесь ДНКаза I- и С1q-содержащих магнитоуправляемых гранул в рамках острого эксперимента позволяет уменьшить как содержание циркулирующей ДНК, так и выраженность патогенного эффекта антител к двуспиральной ДНК, введённых животным.

При экстракорпоральной перфузии крови крыс *in vivo* через смесь ДНКаза I- и С1q-содержащих магнитоуправляемых гранул не выявлено признаков острой токсичности, связанных с данной процедурой.

Соответствие диссертации паспорту специальности

Цель данной диссертации соответствует формуле и области исследования специальности 14.01.22 «ревматология» в аспекте разработки новых методов иммуносупрессивной и иммуномодулирующей терапии СКВ, а также создания комплексного подхода к коррекции иммунопатологических нарушений с использованием патогенетической терапии. Основные результаты диссертационного исследования, имеющие научную и практическую новизну, отвечают пунктам 2 и 4 паспорта специальности 14.01.22 «ревматология».

Внедрение в практику

Результаты диссертационного исследования внедрены в практику работы НИИ КиЭР РАМН (г. Волгоград). Информация, полученная в ходе данной работы, была использована при регистрации патента РФ на изобретение №2356585 и при составлении рассматриваемой в настоящее время заявки на патент РФ на изобретение № 2010128582.

Апробация диссертации

Основные положения диссертации были представлены на итоговых научных конференциях студентов и молодых ученых Волгоградского государственного медицинского университета (2007 – 2010 гг), 80-й конференции студенческого научного общества Санкт-Петербургской государственной медицинской академии им. И.И. Мечникова «Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2007 г), III Международной Пироговской студенческой научной медицинской конференции (Москва, 2008 г), XVII Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Мо-

сква, 2010 г). Первичная экспертиза диссертации была проведена на совместном заседании Ученого совета НИИ КиЭР РАМН и кафедры госпитальной терапии ГОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» 14 июня 2011 года (протокол № 1).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, из которых 6 – в центральной печати (в том числе 3-в рецензируемых ВАК) и 5 – в местной печати.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 187 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, глав с изложением использованных методов исследования, клинической характеристики пациентов, результатов собственных исследований, их обсуждения, выводов, практических рекомендаций и приложений. Работа иллюстрирована 37 рисунками и 27 таблицами. Библиографический указатель включает 460 источников, в том числе 75 – на русском языке и 385 – на иностранных языках. Диссертация дополнена 7 приложениями.

Методы исследования

Иммобилизацию производили методом эмульсионной полимеризации в потоке газообразного азота с включением магнитного материала [И.П. Гонтарь и соавт., 2006]. Для получения магнитоуправляемых гранул (МГ) использовали препараты ДНКазы I (Merck, Германия, удельная активность 3436 единиц Kunitz/мг), [Kunitz M., 1950] и C1q (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США). МГ-плацебо синтезировали тем же методом без добавления иммобилизируемого вещества. Для повторного использования все типы гранул регенерировали в 0,1М глицин-HCl буфере pH 2,2 в течение 10 мин и затем в ФСБР до нейтрального значения pH.

Исследуемые маркеры были разделены на 2 группы: показатели эффективности и показатели безопасности. Первая из них включала уровень фиксации IgG в почках (IgG_ф), измеренный методом прямой иммунофлюоресценции на криосрезах ткани почек крыс толщиной 5±1 мкм [Джонсон Дж., 1991]. IgG_ф выражали как максимальный титр конъюгата, при котором флюоресценция в опытном образце визуально превышала таковую в нейтрализованном контроле. Содержание ЦИК в сыворотке крови определяли методом преципитации в полиэтиленгликоле [Лемперт Б.А., 1988] и выражали в относительных единицах поглощения (Ед), верхней границей нормы считали 4 Ед. Концентрацию анти-дсДНК класса IgG в сыворотке крови оценивали методом ИФА, используя коммерческий диагностикум (Orgentec Diagnostika GmbH, Майнц, Германия). Границей между положительными и отрицательными результатами являлось значение 20 МЕ/мл. Концентрацию ДНК в плазме крови измеряли флуориметрическим методом, применяя флуорофор «PicoGreen» (Invitrogen-Molecular Probes, Юджин, США); плазму депротеинизировали по методу Н.А. Федорова и соавт. (1986). С целью контроля безо-

пасности измеряли динамику концентраций эритроцитов (Э), лейкоцитов (Л), тромбоцитов (Т), общего белка (ОБ), креатинина крови (Кр), активностей аспартат- и аланинаминотрансферазы (АсАТ, АлАТ) и времени свертывания крови (ВСК), которые исследовали унифицированными методами [Меньшиков В.В., 1987].

Статистический анализ полученных данных осуществляли с помощью программы SPSS 14.0 for Windows (SPSS Inc., Чикаго, США, 2005 г.). Выбор статистических методов для решения отдельных задач производили в соответствии с общепринятыми рекомендациями [Гланц С., 1998; Зайцев В.М. и соавт., 2003; Гринхальх Т., 2006]. При нормальном распределении признака его центральную тенденцию и вариабельность характеризовали как «среднее арифметическое (95% доверительный интервал)» (M (95%ДИ)) либо как «среднее арифметическое \pm среднее квадратическое отклонение» ($M \pm \sigma$), в противном случае – как «медиана (95% доверительный интервал)» (Me (95%ДИ)) либо как «медиана (первый квартиль; третий квартиль)» (Me (Q_1 ; Q_3)). Различия считали достоверными при вероятности ошибки I типа (p) менее 0,05.

Титры преобразовывали в десятичные дроби и выражали центральную тенденцию и вариабельность как среднее геометрическое (95% ДИ). Для использования в рамках методов аналитической статистики титры подвергали предварительному обращению и логарифмированию, при этом приводимые коэффициенты корреляции соответствовали трансформированной переменной.

С целью оценки тенденций изменения биомаркеров в связи с экспериментальным вмешательством вычисляли абсолютные показатели динамики оцениваемых факторов как разность между конечным и исходным значениями; полученные таким образом новые переменные обозначали буквой Δ перед наименованием соответствующего маркера. Темп прироста (ТП) рассчитывали как отношение абсолютной динамики к исходному уровню и выражали в процентах.

Изучение эффективности и безопасности применения МГ для снижения патогенного влияния внеклеточной ДНК при СКВ было разделено на три этапа.

Этап 1. Исследование перфузии через МГ in vitro

Исследования на данном этапе выполнялись в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Международной медицинской ассоциации (1996г.), что подтверждено результатами экспертизы Регионального этического комитета. Отбор больных с верифицированной СКВ осуществляли среди пациентов отделения ревматологии МУЗ «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи №25» (МУЗ ГКБ СМП) г. Волгограда с октября 2006 г по май 2008 г. Критериями включения в группу больных, у которых производился отбор крови для перфузии через МГ in vitro при наличии информированного согласия, достижении 18-летнего возраста, исходным содержанием сывороточных ЦИК, превышающим 4 Ед, и наличием верифицированной

СКВ по диагностическим критериям ACR [Hochberg M.C., 1997]. Активность и течение СКВ определяли по критериям В.А. Насоновой и согласно рабочей классификации клинических вариантов течения СКВ [Насонова В.А., 1972]. Также для оценки активности СКВ применяли индексы SLAM и SLEDAI, рекомендованные к использованию при проведении исследований и клинических испытаний у больных СКВ [Griffiths V. et al., 2005]. При использовании этих шкал степень активности СКВ определялась также как минимальная (0-3 балла), умеренная (4-7 баллов) или высокая (8 и более баллов). Оценку необратимого ущерба для здоровья производили с помощью индекса SLICC/ACR DI [Gladman D. et al., 1996].

Перфузию крови *in vitro* выполняли в оборудованной электромагнитом цилиндрической стеклянной колонке объемом 40 мл со скоростью 10 мл/ч, используя МГ с иммобилизированной ДНКазой I. До и после перфузии в изолированных образцах крови измеряли уровни вышеперечисленных лабораторных маркеров, за исключением IgG_φ, Кр, АсАТ, АлАТ, ВСК.

Во вторую группу больных СКВ, из постаферезной плазмы крови которых выделяли анти-ДНК, включали пациентов с концентрацией сывороточных анти-дсДНК, превышающей точку разделения положительных и отрицательных результатов не менее чем в 2 раза, а также при наличии показаний для проведения лечебного плазмафереза [Соловьев С.К., Асеева Е.А., 2007]. Плазмаферез (ПФ) осуществляли дискретным методом с помощью пластиковых контейнеров «Гемакон 500/300» в отделении диализа ГКБ СМП №25 г. Волгограда в соответствии с ведомственными нормативными документами. Анти-ДНК из постаферезной плазмы получали методом аффинной хроматографии.

Этап 2. Моделирование на лабораторных животных

Эксперименты, составляющие второй и третий этапы исследования, проводились с использованием самок крыс линии Вистар (возраст 52±2 недели, масса – 781±204 г). Условия содержания, ухода, питания соответствовали общепринятым требованиям, предъявляемым к лабораторным животным при использовании последних в биомедицинских исследованиях (ГОСТ Р 50258-92, приказ МЗ РФ №267 от 19.06.2003 г., приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г., приказ МЗ СССР № 1179 от 10.10.1983 г.). При планировании и проведении экспериментов соблюдались принципы гуманного обращения с животными согласно Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1986г), что подтверждено результатами экспертизы Регионального этического комитета.

Объем выборочной совокупности, необходимый для оценки различий первичной конечной точки (IgG_φ) между двумя подгруппами крыс, рассчитывали, оценивая вариабельность показателя с помощью ранее опубликованных данных [Тареева И.Е., 1976; Van Bruggen M.C. et al., 1996]. Минимальный уровень различий принимали равным 2 рангам,

альфа-риск – 0,05, бета-риск – 0,10. Определенный таким образом необходимый объем обеих групп, включая десятипроцентный резерв с учетом возможного выбывания, составил 22 животных.

С учетом технической невозможности измерения IgG_ф на промежуточном этапе, эффективность моделирования данного параметра проверяли при помощи животных, не входивших в основную часть исследования. Для этого использовались 4 крысы-самки аналогичного возраста. У 2 из них декапитация и забор почек были произведены после предварительного выполнения моделирующих процедур в соответствии со стандартным протоколом, 2 других животных до декапитации оставались интактными.

В рамках экспериментальных этапов исследования эффективность МГ изучали на экспериментальной модели, имитирующей основные изменения катаболизма ДНК при СКВ: значительное увеличение общего количества внеклеточной ДНК, функциональную недостаточность системы мононуклеарных фагоцитов и наличие высокоavidных аутоантител к ДНК. Хроматинсодержащий экстракт предварительно получали из бычьей печени [Пруссов А.Н., Зацепина О.В., 2002]. Размороженный экстракт нагревали до 37°C и вводили крысам интраперитонеально в дозе 10 мл/кг массы тела [Jiang N. et al., 2003]. По истечении 4 часов в латеральную хвостовую вену вводили выделенные на первом этапе анти-ДНК в дозе 1 мг/кг массы тела [Ben Chetrit E. et al., 1985] в стерильном 0,9% растворе NaCl с температурой 37°C. Непосредственно перед введением экстракта и через 5 минут после инъекции антител производили отбор крови из латеральной хвостовой вены для проверки адекватности моделирования путем оценки динамики вышеперечисленных лабораторных показателей.

Этап 3. Исследование перфузии через МГ in vivo

Дизайн заключительной стадии эксперимента был построен по принципу рандомизированного плацебо-контролируемого исследования в параллельных группах. Животным, включённым в основную подгруппу, производили перфузию крови in vivo через смесь МГ с иммобилизированной ДНКазой I и МГ с иммобилизованным Clq; контрольная подгруппа подвергалась аналогичной процедуре с МГ-плацебо. Эффективность и безопасность перфузии оценивали, сопоставляя в этих подгруппах динамику вышеперечисленных лабораторных показателей. Оценка первичной конечной точки производилась с «ослеплением» исследователя по групповой принадлежности образца. Прочие лабораторные маркеры, относившиеся к аппарат-зависимым и не испытывавшие столь сильного смещения ожидания, измерялись без «ослепления».

Контур для перфузии in vivo состоял из приводящей и отводящей магистралей, реакционной мини-колонки CRC (MoViTec GmbH, Геттинген, Германия), перистальтического насоса Microperplex (LKB, Швеция), установленного на приводящую магистраль, и пузырьковой ловушки на отводящей магистрали. С целью профилактики воздушной эмболии ток

крови через мини-колонку был направлен снизу вверх. Перед перфузией контур промывали 10 мл 70% этилового спирта, затем 20 мл стерильного 0,9% раствора NaCl. Для экспериментов с животными основной группы рабочую камеру мини-колонки объемом 0,2 мл, ограниченную фильтрами с размером пор 35 мкм, заполняли смесью МГ с иммобилизированной ДНКазой I и МГ с иммобилизованным С1q в пропорции 3:1 (объем : объем), соответственно. Для контрольной группы использовали МГ-плацебо. Общий объем контура (без учета объема, вытесненного МГ) составил 5,7 мл.

Сразу после выполнения моделирующего протокола крысу наркотизировали с помощью дробного внутривенного введения тиопентал-натрия (20 мг/кг). Подключение установки для экстракорпоральной перфузии осуществляли вено-венозным способом путем катетеризации бедренных вен, используя иглы-«бабочки» диаметром 26-27G. К иглам, фиксированным к коже, присоединяли коммутирующие магистрали. Установку заполняли кровью, в отводящую магистраль для компенсации экстракорпорального объема и предупреждения тромбообразования в контуре вводили 10 мл стерильного 0,9% раствора NaCl с температурой 37°C, содержащего гепарин в дозе 150 ЕД/кг массы тела. Перфузию проводили со скоростью 1 мл/мин до достижения суммарного объема перфузии 100 мл/кг массы тела [Лысенко В.А. и соавт., 1984], затем отбирали образцы венозной крови. Крысу декапитировали, тщательно обескровливали и извлекали почки. Последние разделяли на блоки размером до 0,5 см³, быстро замораживали в потоке сжатого СО₂ и хранили при -40°C. После перфузии установку отмывали 0,9% раствором NaCl и дезинфицировали 70% этиловым спиртом.

Клиническая характеристика исследуемых групп

В ходе исследования были использованы две группы больных СКВ. Первая группа служила в качестве доноров крови с ДНК-содержащими ЦИК, пациенты второй группы являлись источником постаферезной плазмы для выделения анти-ДНК.

В первую группу было включено 23 пациента с исходным содержанием ЦИК более 4 Ед (31,1% от всей совокупности больных СКВ, госпитализированных в отделение ревматологии МУЗ ГКБ СМП №25 г. Волгограда с октября 2006 г по май 2008 г.). Во вторую группу были включены 19 пациентов, что составило 25,68% от всей совокупности больных СКВ, госпитализированных в отделение ревматологии МУЗ ГКБ СМП №25 г. Волгограда с октября 2006г. по май 2008г. Основные параметры этих групп приведены в таблице 1. Спектр поражения органов и систем как в первой, так и во второй группах не демонстрировал существенных отклонений от ранее опубликованных данных о больших выборочных совокупностях больных СКВ [Иванова М.М., 2004; Зоткин Е.Г., 2009; Vratsanos G. et al., 2001]. Случаев тромбоэмболии легочной артерии, травм и злокачественных новообразований в течение года до

Таблица 1. Основные показатели выделенных групп больных СКВ

Показатель	Первая группа (n=23)	Вторая группа (n=19)
Пол, n (%)		
Женщины	22 (95,65%)	18 (94,74%)
Мужчины	1 (4,35%)	1 (5,26%)
Средний возраст, лет; Me (Q ₁ ; Q ₃)	44,50 (23,75; 50,25)	40,25 (21,00; 58,25)
Средняя длительность болезни, лет; Me (Q ₁ ; Q ₃)	4,50 (3,75; 11,50)	3,50 (2,25; 7,50)
Инвалидность, n (%)		
Нет	4 (17,39%)	2 (10,53%)
III группа	10 (43,48%)	12 (63,16%)
II группа	9 (39,13%)	5 (26,31%)
I группа	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Активность заболевания, n (%)		
Минимальная	6 (26,09%)	1 (5,26%)
Умеренная	13 (56,52%)	14 (73,68%)
Высокая	4 (17,39%)	4 (21,06%)
Средняя активность по шкале SLAM; Me (Q ₁ ; Q ₃)	11 (4; 14)	10 (3; 7)
Средняя активность по шкале SLEDAI; Me (Q ₁ ; Q ₃)	6 (2; 11)	8 (2; 14)
Течение заболевания		
Острое	1 (4,35%)	1 (5,26%)
Подострое	17 (73,91%)	15 (78,95%)
Хроническое	5 (21,74%)	3 (15,79%)
Средняя оценка по шкале SLICC/ACR DI; Me (Q ₁ ; Q ₃)	2,5 (0,5; 6,6)	2,8 (1,3; 5,8)

включения в исследование ни у одного больного из этих групп не диагностировалось.

Все больные СКВ в первой группе получали терапию глюкокортикоидными препаратами. Доза глюкокортикоидов на момент взятия крови или проведения плазмафереза составляла (в пересчете на преднизолон) в среднем 18 (10; 35) мг/сутки. Цитостатические иммунодепрессанты (циклофосфамид или азатиоприн) были назначены 4 (17,39%) больным, при этом в двух случаях эти препараты применялись *per os* в течение всего курса лечения, а у остальных циклофосфамид вводили однократно

инфузионно в дозе 500 мг с последующим переходом на пероральный прием.

Курсы лечебного плазмафереза из 5 сеансов, назначенные согласно терапевтическим показаниям, производили 13 (56,52%) пациентам первой группы и всем больным второй группы в отделении диализа ГКБ СМП №25 города Волгограда. Разовый объем эксфузии составлял 350 ± 20 мл в первой группе и 330 ± 25 мл во второй группе. Дефицит объема циркулирующей плазмы восполняли после каждой процедуры путем введения коллоидных и/или кристаллоидных растворов общим объемом 690 ± 125 мл (в первой группе) или 640 ± 110 мл (во второй группе). Случаев применения гемодиализа ни в одной из групп зафиксировано не было.

Результаты собственных исследований и их обсуждение

Исследование перфузии через МГ in vitro

Показатели эффективности

В результате перфузии изолированной крови больных СКВ через ДНКазы I-содержащие МГ отмечалось статистически значимое снижение средних концентраций ЦИК (с 7,63 (6,70-8,56) Ед до 2,85 (1,97-3,73) Ед; $p=0,012$, парный t-критерий Стьюдента (ПКС)) и ДНК (со 141,05 (129,87-152,23) нг/мл до 49,66 (41,52-57,80) нг/мл; $p=0,003$, ПКС); при этом у 8 (34,78%) пациентов содержание ЦИК в сыворотке крови нормализовалось, став менее 4 Ед. Средняя концентрация анти-дсДНК, напротив, демонстрировала недостоверное повышение относительно исходного уровня (с 46,44 (36,85-56,03) МЕ/мл до 53,66 (43,18-64,14) МЕ/мл; $p=0,144$, ПКС). Средние значения Δ ЦИК, Δ ДНК и Δ Анти-дсДНК составляли -4,78 (-5,89 – -3,67) Ед, -91,39 (-154,04 – -28,74) нг/мл и 7,22 (4,51 – 9,93) МЕ/мл, соответственно. Средние ТП этих маркеров были равны: для ЦИК – -62,65 (-82,55 – -42,75)%, для ДНК – -64,79 (-94,20 – -35,38)%, для анти-дсДНК – 15,55 (-0,23 – 31,33)%. Следовательно, в результате перфузии in vitro получено пропорциональное и статистически достоверное снижение величин как ЦИК, так и циркулирующей ДНК на 60-65%. Кроме того, имело место некоторое повышение уровня анти-дсДНК, которое можно объяснить высвобождением антител из ЦИК при разрушении ДНКазой I дезоксирибонуклеинового компонента последних.

Активность СКВ оказывала отчетливое влияние на величину прироста отдельных показателей эффективности перфузии у больных первой группы. Степень постперфузионного снижения средних значений как Δ ЦИК, так и Δ ДНК увеличивалась при возрастании активности заболевания (рис. 1А, Б). Различия Δ ЦИК в зависимости от степени активности СКВ являлись статистически значимыми: для шкалы В.А. Насоновой $p=0,027$, для шкалы SLAM $p=0,033$, для шкалы SLEDAI $p=0,046$ (ANOVA). Имели место статистически значимые обратные корреляционные зависимости умеренной силы между Δ ЦИК и оценкой активности СКВ по шкалам SLEDAI ($r=-0,488$; $p=0,018$) и SLAM ($r=-0,575$; $p=0,004$). Раз-

личие средних значений Δ ДНК при минимальной, умеренной и выраженной активности патологического процесса было, в отличие от Δ ЦИК, статистически недостоверным. Тем не менее, корреляция между Δ ДНК и величинами индексов активности СКВ достигала уровня статистической значимости: для SLAM $r=-0,349$, $p=0,042$; для SLEDAI $r=-0,433$, $p=0,037$. Существенных колебаний Δ Анти-дсДНК в зависимости от активности основного заболевания, равно как и отчетливых корреляций с индексами SLAM и SLEDAI, выявить не удалось (рис. 1B). Достоверных ассоциаций Δ Анти-дсДНК, Δ ЦИК и Δ ДНК со значениями индекса SLICC/ACR DI и вариантами течения СКВ у больных первой группы отмечено не было.

При сопоставлении уровней Δ ЦИК с наличием отдельных проявлений СКВ (таб. 2) достоверно более высокие значения были выявлены у больных с поражением почек. Повышенные значения Δ ДНК были также зафиксированы у пациентов с люпус-нефритом и поражением ЦНС. Существенных различий Δ Анти-дсДНК в зависимости от какого-либо клинического признака нами не выявлено.

Таким образом, постперфузионная динамика содержания ЦИК и ДНК в крови больных СКВ была более выраженной при высокой активности заболевания и наличии поражения почек, а также, в отношении концентрации ДНК, у пациентов с нейролюпусом. Эти данные вполне согласуются с существующими воззрениями, согласно которым активизация СКВ сопровождается увеличением содержания внеклеточной ДНК, в особенности находящейся в составе ИК [Демин А.А. и соавт., 1980; 1982; McCoubrey-Hoyer A. et al., 1984; Tsai C.Y. et al., 1994]. Как известно, последние, образуясь в кровотоке и *in situ*, играют важную роль в формировании поражения почек и ЦНС [Константинова Н.А., 1996; Насонова В.А., 2000; Иванова М.М., 2004]. При изучении взаимосвязи между показателями эффективности перфузии выявлена статистически значимая обратная корреляция умеренной выраженности между Δ ЦИК и Δ ДНК ($r = -0,504$, $p = 0,014$). Она, по нашему мнению, может отражать вариабельность исходного соотношения ДНК в составе ЦИК и «свободной» ДНК у различных пациентов, что, в свою очередь, влияет на абсолютную величину эффекта ДНКазы I в отношении каждой из этих фракций. Других отчетливых корреляций обнаружено не было.

Показатели безопасности

Сравнение исходных значений концентраций форменных элементов крови и ОБ с повторными измерениями после перфузии через ДНКазу I-содержащие МГ не выявило статистически значимых различий для какого-либо из этих маркеров. Значения Δ Э, Δ Л, Δ Т и Δ ОБ составляли $0,38 (-0,11 - 0,87) \times 10^{12}$ л⁻¹, $-0,89 (-1,77 - 0,03) \times 10^9$ л⁻¹, $-27,33 (-70,71 - 16,05) \times 10^9$ л⁻¹ и $5,73 (-2,06 - 13,52)$ г/л, соответственно. ТП этих же показателей были равны $10,61 (-3,19 - 24,41)$ %, $-17,21 (-34,43 - 0,01)$ %, $-10,02 (-20,21 - 0,17)$ % и $8,52 (-3,82 - 20,86)$ %, соответственно.

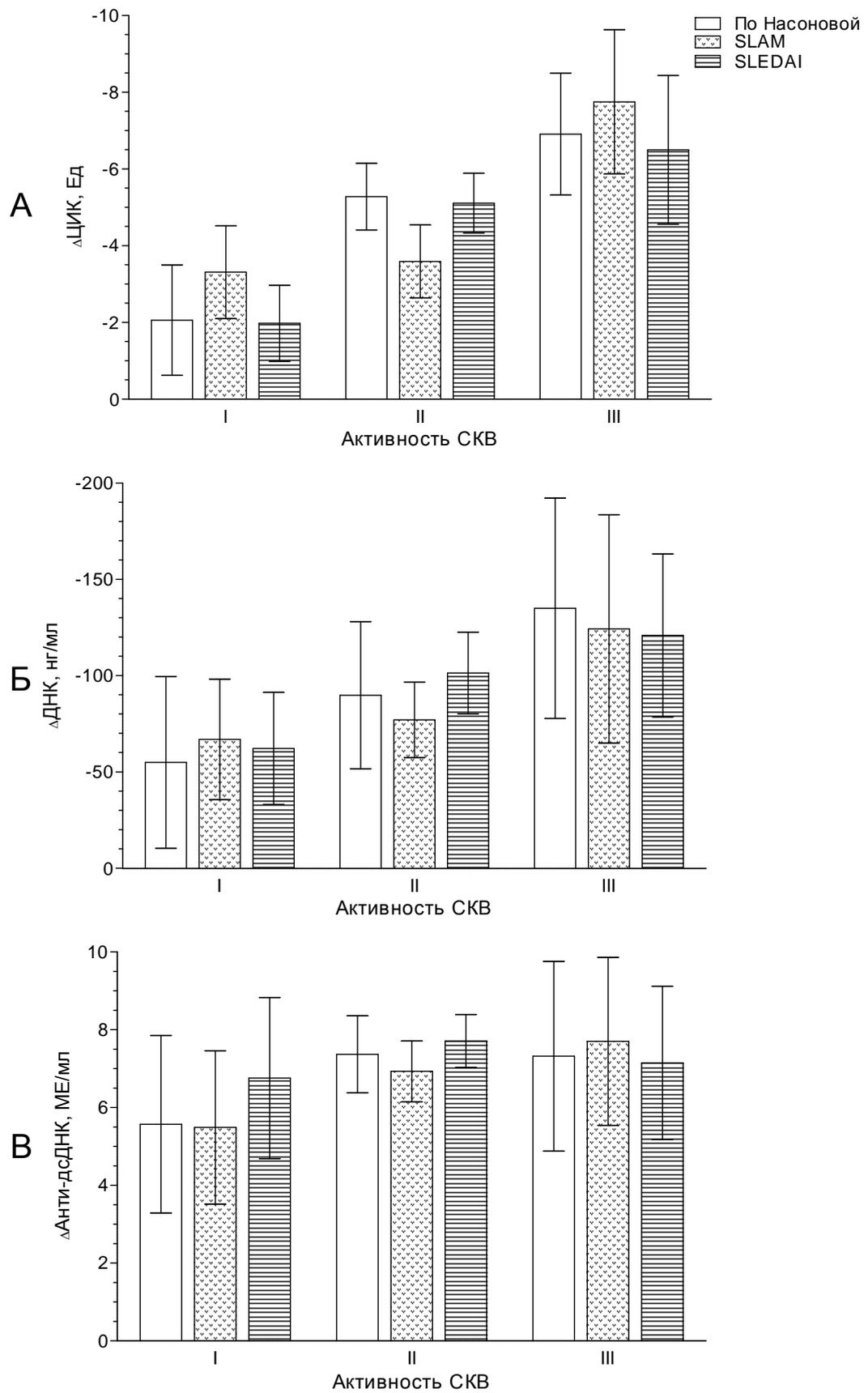


Рисунок 1. Зависимость ΔЦИК (А), ΔДНК (Б) и ΔАнти-дсДНК (В) от активности СКВ. Обозначены среднее арифметическое и 95%ДИ.

Таблица 2. Влияние наличия клиничко-лабораторных проявлений СКВ на абсолютную динамику показателей эффективности перфузии *in vitro*

Признак	n	ΔЦИК, Ед; М (95%ДИ)	ΔДНК, нг/мл; М (95%ДИ)
Нефрит	есть	13	-6,37 (-7,55– -5,19) ³
	нет	10	-3,95 (-5,11– -2,79) ³
Нейролюпус	есть	17	-4,91 (-5,27– -4,55)
	нет	6	-4,73 (-7,08– -2,38)

¹ p<0,001; ² p<0,001; ³ p=0,027; непарный t-критерий Стьюдента (НКС)

Статистически значимых различий абсолютной динамики рассматриваемых показателей в зависимости от возраста пациентов, активности СКВ, типа течения заболевания и наличия отдельных клиничко-иммунологических проявлений СКВ отмечено не было. Ни один из маркеров безопасности перфузии не демонстрировал отчетливой корреляции с индексами SLICC/ACR DI, SLEDAI и SLAM. Кроме того, при выполнении корреляционного анализа статистически значимых взаимосвязей между показателями безопасности перфузии обнаружить не удалось. Не было отмечено достоверных корреляций и при сопоставлении показателей безопасности с маркерами эффективности перфузии. Полученные нами результаты отражали отсутствие на этапе перфузии *in vitro* как отчетливого повреждающего влияния на клетки крови, так и выраженной неспецифической сорбции белковых компонентов плазмы. В этом аспекте свойства МГ с ДНКазой I не отличались от ранее изученных качеств МГ, содержащих другие вещества [Гонтарь И.П., 2006].

* * *

Результаты предварительного этапа исследования подтвердили наличие в крови больных СКВ значительного количества свободной ДНК и ДНК-содержащих ЦИК, которые могут быть эффективно разрушены с помощью ДНКазы I, иммобилизированной на МГ. Однако сопутствовавшее этому процессу нарастание содержания патогенных анти-дсДНК в крови могло затруднить применение данного метода *in vivo* и, в перспективе, для лечения СКВ. С учетом указанного обстоятельства, в дальнейшем нами впервые для перфузии была использована смесь МГ, содержащих ДНКазу I и МГ, содержащих С1q.

Оценка валидности экспериментальной модели

Важным этапом данного исследования являлась оценка эффективности и безопасности перфузии крови экспериментальных животных *in vivo* через смесь МГ, содержащих ДНКазу I и МГ, содержащих С1q. Однако существовавшие лабораторные модели СКВ, включая спонтанные, индуцированные, трансгенные и нокаутные, не воспроизводили с достаточной точностью основные патогенетические особенности СКВ, необходимые для нашего исследования [Stoll M.L., Gavalchin J., 2000]. Кроме того, все наиболее изученные и валидные модели СКВ – мышинные, на

которых выполнение перфузии крови затруднительно. Принимая во внимание изложенные факты, для решения поставленных задач требовалась новая экспериментальная модель, не только имитирующая характерные для СКВ изменения катаболизма ДНК, но и пригодная для экстракорпоральных методов. За основу использованной нами модели был взят метод нагрузки хроматином, разработанный N. Jiang и соавт. (2003), который был дополнен введением антител к ДНК, выделенных из постаферезной плазмы больных СКВ. Выполнение этих процедур на крысах давало возможность проводить экстракорпоральную перфузию с применением мини-колонок, не создавая у животных опасных для жизни расстройств кровообращения.

По окончании моделирующих процедур у 22 самок крыс не отмечалось ни гибели животных, ни существенного ухудшения их общего состояния (нарушений жизненно важных функций, пирогенных реакций), что свидетельствовало об удовлетворительной краткосрочной переносимости моделирующего протокола.

Показатели эффективности

Границы нормы конечных точек исследования ($M \pm 3\sigma$ исходной выборочной совокупности) составляли: для ЦИК 0,0 – 5,42 Ед, для ДНК 42,31 – 67,79 нг/мл, для анти-дсДНК 0,0 – 17,84 МЕ/мл. Превышение верхней границы нормы для концентрации ДНК₀ отмечалось у 2 (9,09%) крыс (81,16 нг/мл и 100,94 нг/мл), все исходные значения двух других переменных находились в пределах соответствующих диапазонов. В последующем животные, у которых были отмечены «выбросы», не использовались для статистической обработки.

В результате проведения моделирующих процедур в крови крыс увеличивалось содержание ЦИК – с 2,65 (2,25 – 3,05) Ед до 7,03 (6,40 – 7,66) Ед, ДНК – с 54,80 (52,94 – 56,66) нг/мл до 123,62 (117,30 – 129,94) нг/мл и анти-дсДНК – с 9,64 (8,39 – 10,89) МЕ/мл до 55,46 (48,20 – 62,72) МЕ/мл. Различия между исходным и конечным значениями каждого из этих параметров были статистически достоверными (для всех маркеров $p < 0,001$; ПКС). Среди показателей эффективности анти-дсДНК демонстрировали наибольший – почти шестикратный – прирост; концентрации ЦИК и ДНК увеличивались в 2-2,5 раза. (см. таблицу 3)

При поиске взаимосвязей между вышеупомянутыми показателями, зарегистрированными после моделирования, выявлены статистически значимые сильные обратные корреляции между ЦИК и анти-дсДНК ($r = -0,702$; $p < 0,001$) и между ДНК и анти-дсДНК ($r = -0,528$; $p = 0,017$). Кроме того, в ходе анализа динамических показателей выявлены умеренно выраженная достоверная обратная корреляция между Δ ЦИК и Δ Анти-дсДНК ($r = -0,407$; $p = 0,041$), а также обратная корреляция между Δ ДНК и Δ Анти-дсДНК ($r = -0,525$; $p = 0,010$).

У обеих интактных крыс IgG_Ф в почках не визуализировался, тогда как у двух особей, подвергавшихся введению анти-ДНК и хроматина, титры IgG_Ф составляли 0,063 и 0,031; среднее геометрическое 0,044.

Таблица 3. Динамика маркеров эффективности и безопасности на этапе моделирования

Маркер	Абсолютная динамика (Δ), М (95%ДИ)	Темп прироста, % (95%ДИ)
ПОКАЗАТЕЛИ ЭФФЕКТИВНОСТИ		
ЦИК, Ед	4,38 (3,76 – 5,00)	165,28 (145,75 – 184,81)
ДНК, нг/мл	68,82 (66,05 – 80,59)	125,58 (98,59 – 152,57)
Анти-дсДНК, МЕ/мл	45,82 (39,65 – 51,99)	475,31 (440,69 – 509,93)
ПОКАЗАТЕЛИ БЕЗОПАСНОСТИ		
Эритроциты, $\cdot 10^{12} \text{ л}^{-1}$	-0,18 (-0,84 – 0,48)	-2,46 (-5,21 – 0,29)
Лейкоциты, $\cdot 10^9 \text{ л}^{-1}$	2,78 (2,01 – 3,55)	27,15 (16,28 – 38,02)
Тромбоциты, $\cdot 10^9 \text{ л}^{-1}$	4,41 (-14,10 – 22,92)	0,78 (-1,92 – 3,48)
Общий белок, г/л	-1,49 (-3,10 – 0,12)	-1,88 (-6,55 – 2,79)
Креатинин, мкмоль/л	1,76 (-0,15 – 3,67)	6,08 (-2,18 – 14,34)
АлАТ, мкмоль/(ч·мл)	0,00 (-0,02 – 0,02)	0,00 (-4,56 – 4,56)
АсАТ, мкмоль/(ч·мл)	0,01 (0,0 – 0,02)	0,85 (-2,38 – 4,08)
ВСК, с	-17,80 (-37,46 – 1,86)	-6,27 (-13,71 – 1,17)

В соответствии с вышеизложенными данными, после выполнения моделирующих процедур в крови подавляющего большинства крыс создавалось значительное повышение концентраций ЦИК, внеклеточной ДНК и анти-дсДНК. Параллельно в почках крыс отмечалось появление депозитов человеческого IgG, связанное с отложением введенных анти-дсДНК, в том числе в составе ИК. Отчетливые обратные корреляции анти-дсДНК как с ЦИК, так и с ДНК, вместе с отсутствием статистической взаимосвязи между двумя последними показателями, можно объяснить наличием в кровотоке избытка анти-дсДНК по отношению к антигену при формировании ЦИК, что согласуется с наибольшим темпом прироста этого показателя после завершения моделирования.

Показатели безопасности

Все значения показателей безопасности, за исключением концентрации лейкоцитов, находились внутри границ нормальных диапазонов как до проведения моделирующих манипуляций, так и после них. При анализе концентраций лейкоцитов 8 (40,0%) значений, зарегистрированных после проведения моделирующих процедур, превышали верхнюю границу референтного интервала. Статистически значимое нарастание среднего уровня показателя после моделирования также отмечено толь-

ко для средней концентрации лейкоцитов крови: с 10,24 (9,58 – 10,90) · 10⁹ л⁻¹ до 13,02 (12,36 – 13,68) · 10⁹ л⁻¹ (p < 0,001, ПКС).

Средние значения абсолютных показателей динамики приведены в таб. 3. ТП концентрации лейкоцитов крови отличался максимальным значением среди всех показателей безопасности и был единственным, достоверно отличающимся от нуля. Некоторый прирост уровня креатинина не был статистически значимым.

Отчетливых корреляций между абсолютными показателями динамики маркеров безопасности после выполнения моделирующего протокола обнаружить не удалось. Однако при включении в область поиска маркеров эффективности были выявлены статистически значимые прямые корреляции между ΔЛ и ΔДНК (r = 0,545; p = 0,013), между ΔЛ и ΔЦИК (r = 0,503; p = 0,024), а также обратная корреляция между ΔЛ и ΔАнти-дсДНК, не достигающая достоверного уровня (r = -0,335; p = 0,060). Для прочих маркеров безопасности статистически значимых взаимосвязей с маркерами эффективности отмечено не было.

Следовательно, изучение безопасности моделирующего протокола показало отсутствие гибели животных и острых расстройств жизненно важных функций в процессе его выполнения, а также продемонстрировало отсутствие отчетливых изменений для практически всех контролируемых нами маркеров острой токсичности. Концентрация лейкоцитов крови была единственным показателем безопасности с существенным темпом прироста – 27,15% – и значимыми прямыми корреляциями ΔЛ как с ΔДНК, так и с ΔЦИК. В целом, краткосрочная переносимость моделирующего протокола была вполне удовлетворительной, позволяя проводить следующий этап исследования.

Выявленный лейкоцитоз, по нашему мнению, можно связать с неспецифической реакцией на внутрибрюшинное введение хроматинсодержащего экстракта. Корреляционные взаимосвязи ΔЛ, вероятно, также являлись отражением этого феномена. Незначительная динамика концентрации Кр после введения анти-дсДНК объяснялась, по-видимому, недостаточным для отчетливой реакции временем экспозиции антител перед промежуточным отбором крови. Аналогичные явления при введении животным патогенных анти-дсДНК были описаны другими авторами [Tincani A. et al., 1993; Stoll M.L., Gavalchin J., 2000].

* * *

Индукцированные у крыс изменения концентраций анти-дсДНК, ЦИК, ДНК, равно как и появление депозитов IgG в почках, соотносились с исходными уровнями этих показателей аналогично тому, как уровни данных маркеров при СКВ у человека соотносятся с нормой. Были рассмотрены следующие аспекты валидности модели. Валидность внешних проявлений (face validity) заключалась в сходстве полученных нами изменений показателей катаболизма ДНК у крыс с проявлениями СКВ у

человека; концептуально-структурная валидность (construct validity) – в появлении у крыс одного из главных гистологических маркеров СКВ – отложения ИК в почках. Предсказательная валидность (predictive validity) подтверждалась подобием результатов перфузии крови больных СКВ *in vitro* и данных, полученных на крысах *in vivo*. Следовательно, валидность данной модели в отношении расстройств катаболизма нуклеопротеидов следует признать вполне достаточной для доклинического испытания. Данная модель не воспроизводит всего спектра проявлений СКВ. Тем не менее, в отсутствие иных способов доклинической оценки эффективности перфузии крови через ДНКазы I-содержащие МГ при СКВ, равно как и адекватных лабораторных моделей этого заболевания, избранный нами метод представляется вполне целесообразным.

*Исследование перфузии через МГ *in vivo**

В результате рандомизации были сформированы основная подгруппа, подвергавшаяся перфузии крови через ДНКазы I- и C1q-содержащие МГ, и контрольная подгруппа, для которой была предусмотрена перфузия через МГ-плацебо. С учетом исключения из исследования 2 (9,09%) крыс ввиду обнаружения «выбросов» в исходных значениях маркеров эффективности, окончательный объем выборочной совокупности составил по 10 животных в каждой из подгрупп. В соответствии с результатами повторной оценки, такая численность являлась достаточной для выявления различий первичной конечной точки. Сравнение подгрупп по доперфузионным значениям возраста, веса, показателей эффективности и безопасности не выявило статистически значимых отличий, отражая однородность выборочных совокупностей по исследуемым признакам.

По окончании перфузии через МГ *in vivo* не наблюдалось случаев тромбообразования внутри контура или утечки гранул за пределы рабочей камеры мини-колонки. Также не отмечалось ни существенного ухудшения общего состояния животных (нарушений жизненно важных функций, пирогенных реакций, значительных наружных кровотечений), ни их гибели.

Основная подгруппа

Показатели эффективности

После выполнения перфузии в основной подгруппе наблюдалось снижение доли случаев, превышающих верхнюю границу нормы ЦИК, с 8 (80,0%) до 2 (20,0%), $p = 0,031$ (критерий Макнемара); при этом частота аналогичных вариантов для ДНК также уменьшилась с 9 (90,0%) до 0 (0,0%), $p = 0,004$ (критерий Макнемара). Кроме того, было достигнуто снижение средней концентрации ЦИК до 2,37 (1,49 – 3,25) Ед и средней концентрации ДНК до 60,73 (48,89 – 72,57) нг/мл, что приближалось к средним значениям этих маркеров до начала эксперимента (рис. 2). Различия между средними значениями до и после перфузии были статистически значимыми как для ЦИК, так и для ДНК ($p < 0,001$ для обоих показателей; ПКС). Напротив, средняя концентрация анти-дсДНК после перфузии несколько увеличивалась до 61,24 (49,76 – 72,72) МЕ/мл, не

достигая, однако, статистически значимого уровня отличия по сравнению с доперфузионным значением. Средний титр IgG_Ф после перфузии через ДНКазу I-содержащие МГ составлял в основной подгруппе 0,233 (0,135 – 0,403).

Средние уровни ΔЦИК, ΔДНК и ΔАнти-дсДНК приведены в таб. 4. При сравнении средних ТП этих маркеров (таб. 4) отмечено пропорциональное уменьшение концентрации как ЦИК, так и ДНК – на 66,33% и 51,85%, соответственно. Напротив, ТП анти-дсДНК был положительным (10,36%), однако не показал достоверного отличия от нуля. Следовательно, эффективность разрушения ферментом ЦИК и ДНК *in vivo* не уступала действию МГ с ДНКазой I при перфузии *in vitro*. Кроме того, прирост анти-дсДНК был в 1,5 раза меньше по сравнению с предварительным этапом, что отражает эффект иммобилизованного С1q. Для более полного нивелирования этого феномена необходимо, вероятно, увеличить долю МГ с С1q в препарате.

В результате поиска статистических взаимосвязей между конечными точками исследования в основной подгруппе выявлены следующие корреляции: для титра IgG_Ф и ΔДНК $r = -0,716$, $p = 0,020$; для титра IgG_Ф и ΔЦИК $r = -0,655$, $p = 0,034$; для титра IgG_Ф и ΔАнти-дсДНК $r = 0,314$, $p = 0,039$. Такое сочетание может отражать зависимость между величиной эффекта иммобилизованного фермента и интенсивностью формирования депозитов ИК в почках. Кроме того, зафиксирована обратная корреляция умеренной силы между ΔЦИК и ΔДНК ($r = -0,311$; $p = 0,055$), которая сопоставима с взаимосвязью между этими показателями на первоначальном этапе исследования.

Показатели безопасности

Внутри границ нормальных диапазонов находились все как исходные, так и конечные значения концентраций Э, Т, ОБ, а также активностей АсАТ и АлАТ. Превышения верхних границ референтных интервалов до перфузии зарегистрированы для концентрации Л ($n = 4$ (40,0%)), а после перфузии – для концентрации Л ($n = 9$ (90,0%)), Кр ($n = 6$ (60,0%)) и ВСК ($n = 3$ (30,0%)).

Среди всех изученных маркеров безопасности достоверные изменения средних значений после перфузии были выявлены лишь для концентраций Л, Кр и ВСК (рис. 3). В целом, средняя концентрация Л после каждого этапа исследования демонстрировала отчетливую тенденцию к повышению, со значимыми отличиями в ходе как моделирования ($p < 0,001$, ПКС), так и перфузии ($p < 0,001$, ПКС). Кроме того, у животных основной группы после завершения конечной фазы исследования наблюдалось статистически достоверное увеличение средней концентрации Кр и среднего ВСК по сравнению с доперфузионным уровнем (для каждого из маркеров $p < 0,001$, ПКС), при этом для обоих показателей существенных изменений на предшествующей стадии исследования показано не было (рис. 3).

Средние значения абсолютных показателей динамики, вычисленных при сопоставлении значений до и после перфузии *in vivo*, были

равны: $\Delta Э = 0,07 (-0,16 - 0,30) \cdot 10^{12} \text{ л}^{-1}$, $\Delta Л = 2,13 (1,29 - 2,97) \cdot 10^9 \text{ л}^{-1}$, $\Delta Т = -16,55 (-34,25 - 1,15) \cdot 10^9 \text{ л}^{-1}$, $\Delta ОБ = 0,25 (-0,70 - 1,20) \text{ г/л}$, $\Delta Кр = 15,86 (12,70 - 19,02) \text{ мкмоль/л}$, $\Delta АлАТ = -0,01 (-0,11 - 0,09) \text{ мкмоль/(ч}\cdot\text{мл)}$, $\Delta АсАТ = 0,01 (-0,10 - 0,12) \text{ мкмоль/(ч}\cdot\text{мл)}$, $\Delta ВСК = 82,99 (73,57 - 92,41) \text{ с}$. Наибольший темп прироста в ходе перфузии был продемонстрирован для содержания Л (16,35%), концентрации Кр (52,73%) и ВСК (31,08%); у прочих показателей существенного отличия от нулевых значений выявлено не было (рис. 4). Наряду с отсутствием признаков тромбообразования в контуре, динамика ВСК отражала адекватность дозы гепарина, использованной при проведении перфузии. Тенденция к увеличению содержания Л крови, отмечавшаяся на этапе моделирования, сохранялась и после перфузии, что поддерживало нашу гипотезу о неспецифической реакции на введение хроматинсодержащего экстракта как причине лейкоцитоза.

Отчетливых статистических взаимосвязей между показателями безопасности в основной подгруппе найдено не было. Однако, при сопоставлении показателей безопасности с показателями эффективности были обнаружены значимые корреляции: обратная между $\Delta Кр$ и титром IgG_{Φ} ($r = -0,832$, $p = 0,003$), а также прямые – между $\Delta Кр$ и $\Delta ЦИК$ ($r = 0,638$, $p = 0,047$), а также между $\Delta Кр$ и $\Delta ДНК$ ($r = 0,743$, $p = 0,014$).

Контрольная подгруппа

Показатели эффективности

После выполнения перфузии в контрольной подгруппе не наблюдалось значительного изменения доли случаев, превышающих верхние границы нормы показателей эффективности. Средние значения лабораторных маркеров эффективности, зарегистрированные у крыс контрольной подгруппы после проведения перфузии, приведены в таб. 4. Существенных изменений этих параметров по сравнению с доперфузионными уровнями также выявлено не было (рис. 2). Средний титр IgG_{Φ} в контрольной подгруппе после перфузии через МГ-плацебо составлял 0,051 (0,024 – 0,107). При анализе динамических показателей статистически значимого отличия от нуля ни для одного из рассматриваемых лабораторных маркеров в результате плацебо-перфузии не получено (таб. 4).

В целом, в контрольной подгруппе в результате плацебо-перфузии существенных изменений ЦИК, ДНК и анти-ДНК не наблюдалось. Вместе с тем среднее значение титра IgG_{Φ} было весьма высоким, подтверждая эффективность использованного протокола для моделирования иммунокомплексного нефрита. Также в контрольной подгруппе выявлены умеренно выраженные достоверные обратные корреляции между зарегистрированными после перфузии анти-дсДНК и титром IgG_{Φ} ($r = -0,665$; $p = 0,036$), а также между ЦИК и анти-дсДНК ($r = -0,631$; $p = 0,048$), что, по нашему мнению, могло отражать потребление сывороточных антител при формировании ИК в кровотоке и *in situ*.

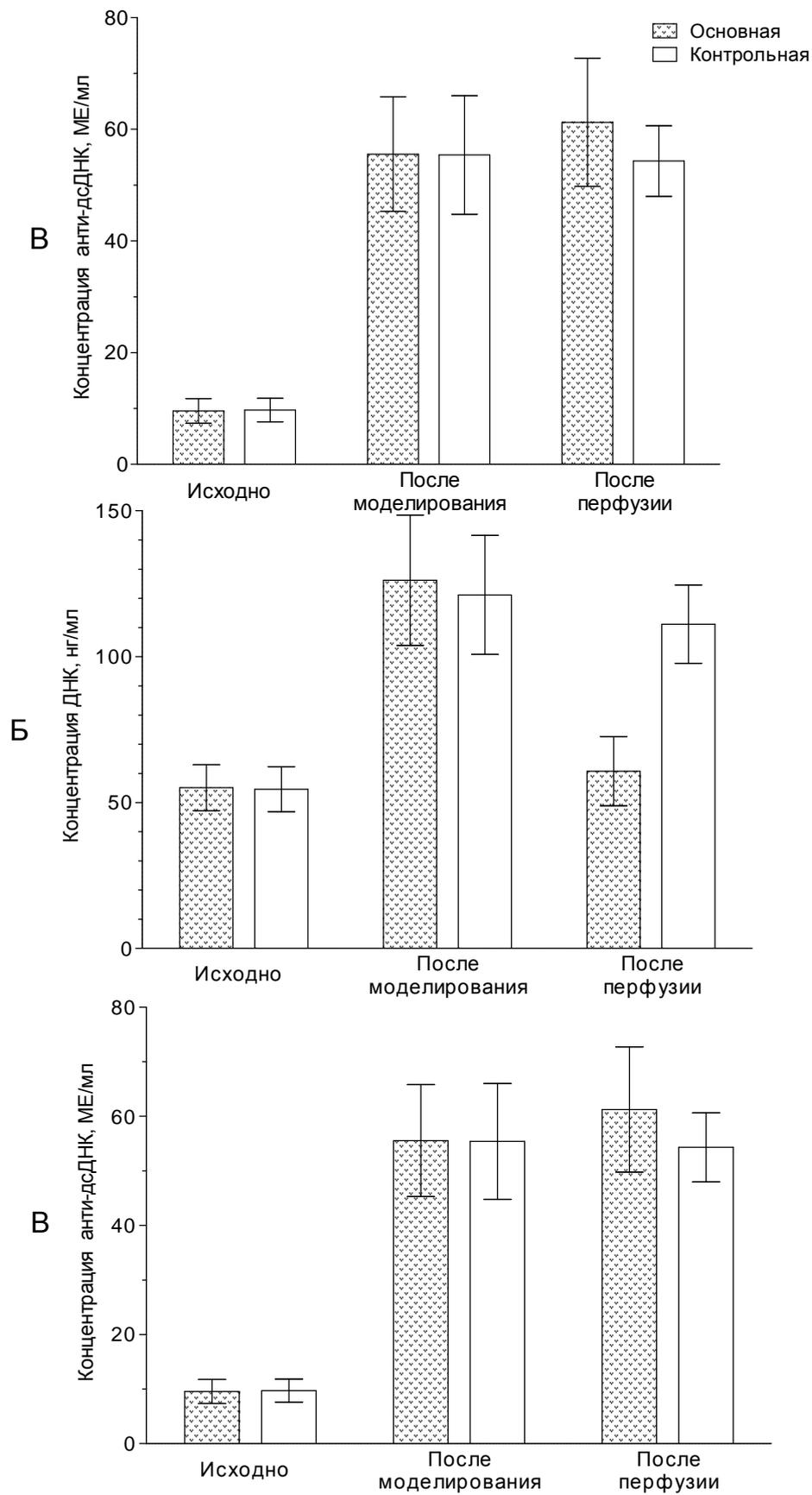


Рисунок 2. Сравнение концентраций ЦИК (А), ДНК (Б) и анти-дсДНК (В) в основной и контрольной подгруппах на различных этапах исследования. Представлены средние арифметические и 95%ДИ.

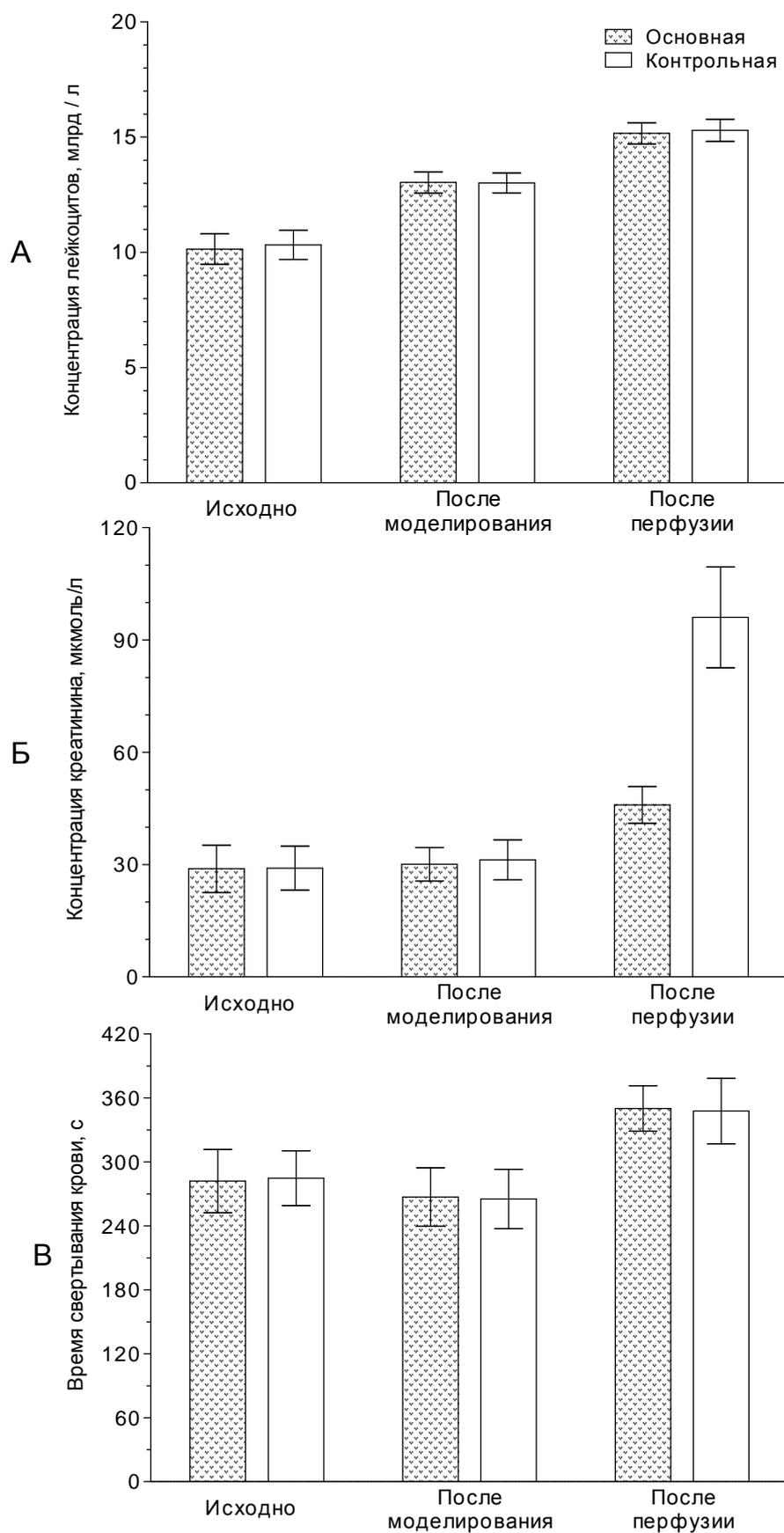


Рисунок 3. Сравнение концентраций Л (А), Кр (Б) и ВСК (В) в основной и контрольной подгруппах на различных этапах исследования. Представлены средние арифметические и 95%ДИ

Показатели безопасности

После плацебо-перфузии все исходные и конечные значения концентраций Э, Т, ОБ, а также активностей АсАТ и АлАТ находились внутри границ нормальных диапазонов. Превышения верхних границ референтных интервалов зарегистрированы до перфузии для концентрации Л ($n = 4$ (40,0%)), а после перфузии – для концентрации Л ($n = 10$ (100,0%)), Кр ($n = 9$ (90,0%)) и ВСК ($n = 3$ (30,0%)). При сравнении средних значений показателей безопасности до и после перфузии через МГ-плацебо статистически значимые различия были выявлены для концентраций Л ($p = 0,005$; ПКС), Кр ($p < 0,001$; ПКС) и ВСК ($p < 0,001$; ПКС) (рис. 3).

В целом, у животных контрольной группы средняя концентрация Л после каждого этапа исследования демонстрировала отчетливую тенденцию к повышению (рис. 3), со значимыми отличиями в ходе как моделирования ($p < 0,001$, ПКС), так и перфузии ($p = 0,005$, ПКС). Кроме того, у крыс контрольной подгруппы после завершения в результате плацебо-перфузии наблюдалось статистически достоверное увеличение средней концентрации Кр и среднего ВСК (в обоих случаях $p < 0,001$, ПКС), при этом на предшествующей стадии исследования существенных изменений данных маркеров показано не было (рис. 3). Эта динамика ВСК, Л и, в меньшей степени, Кр напоминала таковую в основной группе и интерпретировалась нами сходным образом.

Средние значения абсолютных показателей динамики, вычисленных при сопоставлении значений до и после плацебо-перфузии, были равны: $\Delta Э - 0,08 (-0,14 - 0,30) \cdot 10^{12} \text{ л}^{-1}$, $\Delta Л - 2,28 (1,40 - 3,16) \cdot 10^9 \text{ л}^{-1}$, $\Delta Т - 11,42 (-27,06 - 4,22) \cdot 10^9 \text{ л}^{-1}$, $\Delta ОБ - 1,39 (-3,11 - 0,33) \text{ г/л}$, $\Delta Кр - 64,79 (48,00 - 81,58) \text{ мкмоль/л}$, $\Delta АлАТ - 0,01 (-0,10 - 0,08) \text{ мкмоль/(ч·мл)}$, $\Delta АсАТ - 0,01 (-0,09 - 0,07) \text{ мкмоль/(ч·мл)}$, $\Delta ВСК - 82,41 (75,76 - 89,06) \text{ с}$. Наибольший ТП в ходе перфузии был продемонстрирован для концентрации креатинина (207,33%), ВСК (31,08%) и содержания лейкоцитов (17,52%); у прочих маркеров существенной динамики выявлено не было (рис. 4). Корреляционных зависимостей между динамическими показателями безопасности обнаружить в контрольной подгруппе не удалось. При включении маркеров эффективности в область поиска была выявлена статистически значимая обратная корреляция между титром IgG_{Φ} и $\Delta Кр$ ($r = -0,829$, $p = 0,002$).

Сравнение основной и контрольной подгрупп

Показатели эффективности

Статистически значимых различий между основной и контрольной подгруппами на этапе подготовки модели не было обнаружено ни по абсолютным значениям маркеров эффективности, ни в отношении их динамических показателей (рис. 2), что указывало на сопоставимость подгрупп к моменту начала перфузии.

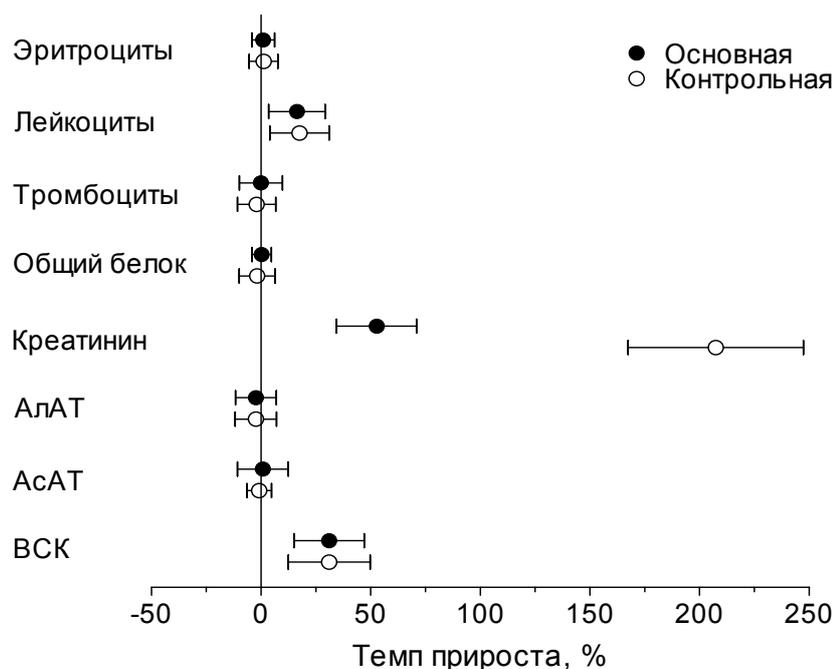


Рисунок 4. Темпы прироста показателей безопасности в основной и контрольной подгруппах после перфузии крови in vivo. Представлены значения показателя и 95%ДИ.

По завершении последней, напротив, были зарегистрированы отличия между подгруппами. Так, в основной подгруппе, подвергавшейся перфузии через МГ с ДНКазой I и C1q, средние уровни ЦИК и ДНК были достоверно меньше по сравнению с плацебо-контролем, что находило отражение и в отличиях подгрупп по динамическим характеристикам данных маркеров (рис. 2; таб. 4). Выраженные отличия между подгруппами были зарегистрированы также и для фиксированных в почках анти-дсДНК (IgG_Ф), титр которых после перфузии через МГ с ДНКазой I и C1q был достоверно ниже по сравнению с плацебо (таб. 4, рис. 5). Некоторое повышение концентрации анти-дсДНК в основной подгруппе по сравнению с плацебо не было статистически значимым. ДИ показателей, характеризующих динамику анти-дсДНК в обеих подгруппах на завершающем этапе исследования, включали нулевое значение, демонстрируя отсутствие достоверных отличий от последнего (таб. 4).

Показатели безопасности

Статистически значимых различий между основной и контрольной подгруппами на этапе подготовки модели не было обнаружено ни по абсолютным значениям маркеров безопасности, ни в отношении их динамических показателей (рис. 3), что указывало на сопоставимость подгрупп к моменту начала перфузии. В частности, статистически значимое повышение концентрации лейкоцитов имело сходную выраженность в обеих подгруппах (рис. 3). После проведения перфузии in vivo прирост концентрации креатинина в основной подгруппе был намного меньше по сравнению с плацебо-контролем – 52,73% и 207,33%, соответственно. Посредством корреляционного анализа была обнаружена обратная зависимость между IgG_Ф и ΔКр, имевшаяся в обеих подгруппах.

Таблица 4. Сравнение показателей эффективности в основной и контрольной подгруппах на этапе перфузии

Показатель	Подгруппы		p
	Основная	Контрольная	
КОНЦЕНТРАЦИЯ ЦИК, Ед			
до перфузии, М (95%ДИ)	7,01 (6,28–7,74)	7,05 (6,32–7,78)	0,928*
после перфузии, М (95%ДИ)	2,37 (1,49–3,25)	7,18 (6,55–7,81)	0,004*
ΔЦИК, М (95%ДИ)	-4,64 (-5,35– -3,93)	0,13 (-0,28–0,54)	<0,001*
ТП, % (95%ДИ)	-66,33 (-96,02– -36,64)	1,84 (-6,49–10,17)	<0,001^
КОНЦЕНТРАЦИЯ ДНК, нг/мл			
до перфузии, М (95%ДИ)	126,12 (103,80-148,44)	121,12 (100,74-141,50)	0,629*
после перфузии, М (95%ДИ)	60,73 (48,89–72,57)	111,09 (97,66-124,52)	<0,001*
ΔДНК, М (95%ДИ)	-65,39 (-80,04– -50,74)	-10,03 (-21,26–1,20)	<0,001*
ТП, % (95%ДИ)	-51,85 (-75,80– -27,90)	-8,28 (-22,36–5,86)	0,009^
КОНЦЕНТРАЦИЯ АНТИ-ДСДНК, МЕ/мл			
до перфузии, М (95%ДИ)	55,53 (45,27–65,79)	55,39 (44,77–66,01)	0,993*
после перфузии, М (95%ДИ)	61,24 (49,76–72,72)	54,30 (47,98–60,62)	0,821*
ΔАнти-дсДНК, М (95%ДИ)	5,71 (-3,41–16,25)	-1,09 (-3,82–1,64)	0,560*
ТП, % (95%ДИ)	10,36 (-8,96–29,68)	-1,97 (-11,68–7,70)	0,274^
Титр IgG _φ			
после перфузии, среднее геометрическое (95%ДИ)	0,233 (0,135–0,403)	0,051 (0,024–0,107)	0,002*

* – непарный t-критерий Стьюдента; ^ – точный критерий Фишера

В основной подгруппе последний также прямо коррелировал с ΔЦИК и ΔДНК. В целом, данные результаты свидетельствовали о том, что использованный протокол позволял моделировать не только формирование клубочковых депозитов ИК, но и связанное с ним нарушение фильтрационной функции. Снижая количество ИК, фиксированного в почках, перфузия крови через МГ с ДНКазой I и С1q, по-видимому, могла уменьшать выраженность аутоиммунного воспаления в эксперименте. Следовательно, динамический контроль уровня креатинина, вероятно, не только способен служить маркером безопасности перфузии, но и косвенно отражает эффективность перфузии. Уровни лейкоцитов и ВСК, отчетливо возросшие на заключительном этапе исследования, напротив, демонстрировали сопоставимую динамику в обеих подгруппах (рис. 3, 4). Прочие показатели безопасности не показали существенных отличий между рассматриваемыми подгруппами.

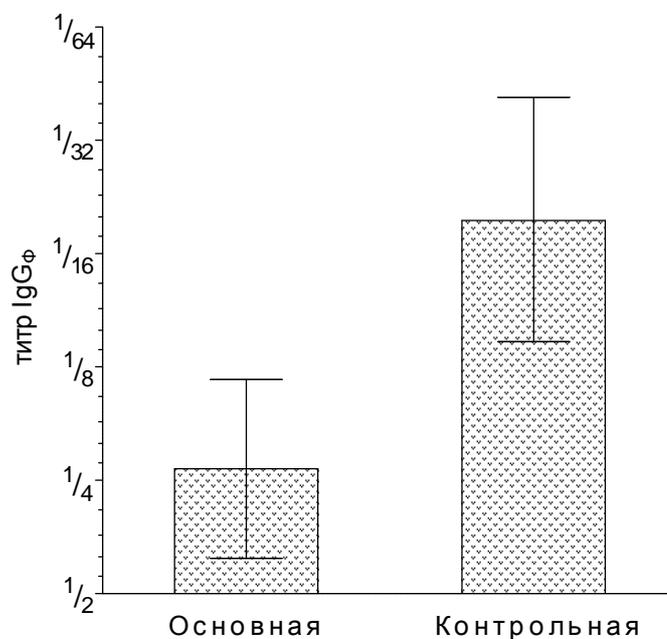


Рисунок 5. Сравнение титров фиксированных в почках IgG в основной и контрольной подгруппах. Представлены средние геометрические и 95%ДИ.

* * *

Основным преимуществом использованного нами интраперитонеального пути введения хроматинсодержащего материала перед единственной упомянутой в литературе модели нарушения катаболизма ДНК [D.S. Terman с соавт., 1976] являлось создание стабильно высокой концентрации внеклеточной ДНК в течение 5-7 часов. Найденное подтверждение высокой эффективности иммобилизованной ДНКазы I как при расщеплении циркулирующих нуклеопротеидов, так и в отношении депозитов анти-дсДНК в почках предоставляет дополнительный аргумент в пользу дальнейших работ в данном направлении.

Обобщая результаты исследования, следует отметить, что продемонстрированная высокая эффективность МГ с иммобилизованными ДНКазой I и C1q создает хорошие предпосылки для углубленного изучения свойств данного способа лечения СКВ в хроническом эксперименте. Необходимым условием проведения последнего является дальнейшее усовершенствование созданной индуцированной модели с целью обеспечения долговременного повышения содержания внеклеточной ДНК и антител к ней. Помимо практических задач, такая модель может быть впоследствии использована для получения информации о важных аспектах патогенеза СКВ, в частности о взаимосвязи между процессом элиминации аутоантигенов и поддержанием иммунологической толерантности.

Выводы

1. Имобилизованная на магнитоуправляемых гранулах ДНКаза I способна разрушать ДНК, находящуюся в свободном и связанном с иммуноглобулинами состоянии в изолированной крови пациентов с системной красной волчанкой.
2. Выраженное снижение свободной и связанной фракций циркулирующей ДНК наблюдается при высокой активности заболевания, наличии поражения центральной нервной системы и почек;
3. Моделирование нарушений катаболизма ДНК при системной красной волчанке путем интраперитонеального введения крысам хроматинсодержащего экстракта с последующей внутривенной инъекцией антител к двуспиральной ДНК может быть использовано для доклинической оценки эффективности и безопасности экстракорпоральных методов лечения системной красной волчанки. Особенностью данной модели является значительное увеличение концентрации лейкоцитов крови;
4. При использовании модели нарушений катаболизма ДНК при системной красной волчанке в ходе рандомизированного контролируемого исследования, в группе крыс, подвергшихся однократной экстракорпоральной перфузии крови *in vivo* через смесь ДНКаза I- и C1q-содержащих магнитоуправляемых гранул, выявлено снижение средних концентраций ДНК, циркулирующих иммунных комплексов и креатинина в крови, а также уменьшение количества фиксированных в почках антител к двуспиральной ДНК по сравнению с плацебо;
5. Изучение безопасности экстракорпоральной перфузии крови крыс *in vivo* через смесь ДНКаза I- и C1q-содержащих магнитоуправляемых гранул в рамках острого эксперимента не выявило значительного снижения содержания форменных элементов и неблагоприятных изменений свертываемости крови, а также признаков гепатотоксичности. Нарастание концентрации креатинина крови, существенно более выраженное в группе плацебо, вероятно, отражало нарушение функции почек вследствие выполнения моделирующих процедур.

Практические рекомендации

1. Исследование экстракорпоральной перфузии крови через смесь ДНКаза I- и C1q-содержащих магнитоуправляемых гранул в качестве компонента комплексной терапии СКВ следует продолжить на доклиническом этапе для уточнения безопасности метода в рамках хронического эксперимента;
2. Для снижения выброса антител к двуспиральной ДНК в ходе перфузии циркулирующих иммунных комплексов через ДНКаза I-содержащие магнитоуправляемые гранулы может быть использован иммобилизованный C1q;
3. Разработанную индуцированную модель нарушения катаболизма нуклеопротеидов при системной красной волчанке рекомендуется использовать при поиске новых методов воздействия на процесс элиминации аутоантигенов при системной красной волчанке.

Публикации

1. Романов А.И., Трофименко А.С., Симакова Е.С., Алехина И.Ю. Перспективы оценки активности сывороточной ДНКазы I и ее ингибиторов в иммунодиагностике системной красной волчанки // **Кремлевская медицина. Клинический вестник.** – 2008. – №1. – С.79-81.
2. Симакова Е.С., Махачев М.А. Роль антител к аденозиндезаминазе при системной красной волчанке / Материалы III Международной Пироговской сту-

денческой науч. мед. конференции (Москва, 20 марта 2008 г) // **Вестник РГМУ.** – 2008. – Т.61, №2. – С.53.

3. Гонтарь И.П., Сычева Г.Ф., Александров А.В., Шилова Л.Н., Симакова Е.С., Емельянов Н.Н., Матасова Н.Н., Маслакова Л.А., Зборовский А.Б. Эмульсионная полимеризация как метод, модифицирующий ферменты с сохранением биологических свойств их наноструктур // **Бюл. эксп. биол. и мед.** – 2010. – Т.150, №12. – С.715-719.

4. Способ очистки крови от ДНК-содержащих иммунных комплексов с помощью иммобилизованного гранулированного магнитоуправляемого препарата: **пат. RU 2356585 С2**/И.П. Гонтарь, А.С. Трофименко, А.Б. Зборовский, Л.Н. Шилова, Е.С. Симакова. – №2007105420/15; заявл. 13.02.2007; опубл. 27.05.2009, Бюл. №15. – 5 с.

5. Симакова Е.С. Клинико-иммунологические особенности проявления антифосфолипидного синдрома у больных системной красной волчанкой // **Человек и его здоровье-2007: Материалы 80-й конф. студенческого науч. общества СПбГМА им. И.И. Мечникова / Под ред. акад. РАМН А.В. Шаброва и др.** – СПб., 2007. – С.204-205.

6. Трофименко А.С., Симакова Е.С. Влияние актина и антител к ДНК-азе I на активность фермента при системной красной волчанке // **Актуальные проблемы клинической и экспериментальной медицины. Материалы 65-й юбилейной открытой научно-практической конф. молодых ученых и студентов / Под ред. акад. РАМН В.И. Петрова.** – Волгоград: Изд-во ВолГМУ, 2007. – С.104.

7. Трофименко А.С., Симакова Е.С., Зборовская И.А., Алехина И.Ю., Красильников А.Н., Гонтарь И.П. Изучение ассоциации антител к дезоксирибонуклеазе I с клинико-лабораторными проявлениями системной красной волчанки // **Актуальные проблемы современной ревматологии. Сборник науч. работ / Под ред. акад. РАМН А.Б. Зборовского.** – Вып.25. – Волгоград, ООО «Царицынская полиграфическая компания», 2008. – С.112-113.

8. Гонтарь И.П., Сычева Г.Ф., Симакова Е.С., Трофименко А.С., Маслакова Л.А. Эмульсионная полимеризация как метод, модифицирующий кардиолипид с сохранением его антигенных свойств // **Актуальные проблемы современной ревматологии. Сборник науч. работ / Под ред. акад. РАМН А.Б. Зборовского.** – Вып.26. – Волгоград, ООО «Царицынская полиграфическая компания», 2009. – С.16-17.

9. Трофименко А.С., Симакова Е.С., Емельянова О.И., Трубенко Ю.А., Гонтарь И.П. Использование магнитоуправляемых гранул для очистки крови больных системной красной волчанкой от ДНК-содержащих иммунных комплексов // **Актуальные проблемы современной ревматологии. Сборник науч. работ / Под ред. акад. РАМН А.Б. Зборовского.** – Вып.26. – Волгоград, ООО «Царицынская полиграфическая компания», 2009. – С.80-81.

10. Симакова Е.С., Трофименко А.С. Моделирование на крысах нарушений катаболизма ДНК при системной красной волчанке // **Актуальные проблемы современной ревматологии. Сборник научных работ / Под ред. акад. РАМН А.Б. Зборовского.** – Вып.27. – Волгоград, ООО «Царицынская полиграфическая компания», 2010. – С.87-88.

11. Симакова Е.С., Трофименко А.С., Гонтарь И.П., Зборовская И.А. Перспективы применения ДНКазы I-содержащих магнитоуправляемых гранул для экстракорпорального лечения люпус-нефрита // **Материалы XVII Российского национального конгресса «Человек и лекарство».** – М., 2010. – С.717.

Симакова Екатерина Станиславовна

Экспериментальное обоснование применения
иммобилизированной дезоксирибонуклеазы I типа
при лечении системной красной волчанки

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Волгоградский государственный медицинский университет
400131, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1.

Подписано к печати 05.08.2011
Формат 60×84 /16. Бумага офсетная.
Тираж 100 экз. Усл. печ. л. 1,0. Заказ 188.
Отпечатано с готового оригинал-макета
в типографии издательства «Перемена»,
400131, г. Волгоград, пр. Ленина, 27.