



<https://doi.org/10.34883/PI.2024.13.1.002>
УДК 616.5-022:3.3.8



Емельянова О.И.✉, Трофименко А.С., Русанова О.А.

Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А.Б. Зборовского, Волгоград, Россия

Фибронектин как диагностический маркер системной красной волчанки

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Емельянова О.И. – проведение лабораторных исследований, написание текста статьи; Русанова О.А. – проведение клинической части исследования, статистическая обработка данных; Трофименко А.С. – организация исследования, редактирование текста статьи.

Подана: 04.05.2023

Принята: 12.02.2024

Контакты: emelyanova.vlg@mail.ru

Резюме

Цель. Разработка дополнительных критериев лабораторной диагностики системной красной волчанки с использованием технологии иммунохимического исследования на основе иммобилизированной формы фибронектина с магнитными свойствами.

Материалы и методы. В исследование было включено 48 пациентов с системной красной волчанкой. Все пациенты были в возрасте от 18 до 65 лет с продолжительностью заболевания от 3 до 24 лет и находились на стационарном лечении в специализированном отделении ГУЗ «ГКБ СМП № 25» г. Волгограда при наличии информированного согласия и подтвержденного диагноза СКВ. Верификацию диагноза осуществляли согласно критериям ACR 1997 г. Оценка активности данного заболевания проводилась с использованием шкалы ECLAM. Для выявления антител к ФН у пациентов с СКВ и контрольной группы применялся иммуноферментный метод с использованием магнитосорбентов.

Результаты. Установлено, что у пациентов с системной красной волчанкой содержание общего ФН плазмы составило в среднем $643,28 \pm 38,4$ мкг/мл, что было достоверно выше аналогичного показателя у здоровых лиц ($p < 0,05$), а также выявлен повышенный уровень антител к нему по сравнению с таковым в контрольной группе. Обнаружена статистически значимая зависимость концентрации иммуноглобулинов к фибронектину от активности и характера течения основного заболевания. Показано, что аутоантитела к фибронектину чаще выявляются при СКВ с высокой активностью болезни, подострым и острым течением заболевания. В результате проведенных нами исследований была выявлена связь между содержанием ФН и АТ к нему у пациентов с СКВ и поражением органов и систем. Анализ полученных результатов показал, что максимальный уровень исследуемых АТ наблюдался при СКВ с поражением почек и сердечно-сосудистой системы и статистически достоверно превосходил аналогичные показатели у пациентов с другими висцеральными проявлениями ($p < 0,05$).

Заключение. Мониторинг уровня АТ к иммобилизированной форме ФН целесообразно использовать с целью повышения эффективности иммунодиагностики СКВ и прогнозирования клинического варианта течения.

Ключевые слова: фибронектин, системная красная волчанка, диагностика, магнитосорбенты, антитела

Emelyanova O.✉, Trofimenko A., Rusanova O.
Research Institute for Clinical and Experimental Rheumatology
named after A.B. Zborovsky, Volgograd, Russia

Fibronectin as a Diagnostic Marker of Systemic Lupus Erythematosus

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Emelyanova O. – conducting laboratory research, text writing; Rusanova O. – clinical part of the study conducting, statistical data processing; Trofimenko A. – study managing, text editing.

Submitted: 04.05.2023

Accepted: 12.02.2024

Contacts: emelyanova.vlg@mail.ru

Abstract

Purpose. To develop additional criteria for systemic lupus erythematosus laboratory diagnosis using immunochemical assay technique based on immobilized form of fibronectin with magnetic properties.

Materials and methods. 48 patients with systemic lupus erythematosus were included in the study. All patients were aged from 18 to 65 years with disease duration from 3 to 24 years and underwent inpatient treatment in the specialized department of Hospital no 25 of the Volgograd city, with informed consent and confirmed diagnosis of SLE. The diagnosis verification was performed according to the ACR–1997 criteria. The assessment of the disease activity was performed with ECLAM scale. To detect anti-FN antibodies in patients with SLE and controls, an enzyme-linked immunosorbent assay with magnetosorbents was applied.

Results. It was determined that in patients with systemic lupus erythematosus the total plasma FN level averaged $643.28 \pm 38.4 \mu\text{g/mL}$, being significantly higher than in healthy individuals ($p < 0.05$), and an increased anti-FN antibodies level was also detected compared to that in the control group.

A statistically significant correlation between anti-fibronectin immunoglobulins levels and the character of the course of the underlying disease was found. It was shown that autoantibodies against fibronectin were more often detected in SLE with high disease activity, in subacute and acute disease course. As a result of our research, the relationship between FN and anti-FN antibodies levels in patients with SLE and organs and systems involvement was revealed. The analysis of the results obtained demonstrated that the maximum level of AT studied associated with renal and cardiovascular involvement and it was statistically significantly higher than in patients with other visceral manifestations ($p < 0.05$).

Conclusion. To increase the efficiency of SLE immunodiagnostics and to predict SLE clinical course, it would be advisable to monitor AT against immobilized FN.

Keywords: fibronectin, systemic lupus erythematosus, diagnostics, magnetosorbents, antibodies



■ ВВЕДЕНИЕ

Системная красная волчанка (СКВ) относится к группе воспалительных ревматических заболеваний, в основе патогенеза которой лежат дефекты иммунорегуляции, способные привести к неконтролируемой гиперпродукции аутоантител к компонентам собственных тканей, а это, в свою очередь, обуславливает развитие воспаления, затрагивающего многие органы и системы. Диагностика СКВ представляет собой клинически управляемый процесс с использованием различных биомаркеров, которые могут быть информативными для определения восприимчивости к заболеванию, диагностики и оценки активности его течения. К числу потенциальных биомаркеров СКВ относятся антитела к двуспиральной ДНК и антинуклеосомные аутоантитела, комплемент, белки острой фазы, фибронектин, цитокины и растворимые цитокиновые рецепторы [1, 2].

Фибронектин (ФН) представляет собой многодоменный многофункциональный высокомолекулярный гликопротеин, участвующий в процессах, связанных с взаимодействием клетки с матриксом. Он играет важную роль в ремоделировании внеклеточного матрикса, адгезии, миграции, пролиферации, восстановлении тканей. Плазменный ФН считается биологически неактивным, но при повреждении эндотелия и в процессе репарации ФН плазмы может поступать во внесосудистое пространство, менять конформацию белка с глобулярной на фибриллярную, формировать мультимеры и агрегаты, а также предварительную матрицу. В молекуле ФН обнаружены специальные локусы, с помощью которых он связывается с фактором XIIIa, фибрином, коллагеном, гепарином. Показано также, что на мембране фагоцитов имеется специальный рецептор к ФН. Последний способен к перекрестному реагированию с фибриногеном при формировании кровяного сгустка, обладает высоким сродством к фибрину и фибриногену. ФН способен связываться с последующей преципитацией белка при +4 °C [3–5], а также индуцировать аутоиммунный процесс, при котором специфические иммуноглобулины могут вызывать деструкцию соединительной ткани. Многогранность свойств этого гликопротеина обеспечивается наличием в его структуре специализированных участков-доменов, основными из которых являются коллагенсвязывающий и клеточный. Именно наличие свободных коллагеновых доменов и является определяющим фактором функциональной активности ФН при ревматических заболеваниях, в этих участках и происходит связывание антител (АТ) и ФН за счет Fab-фрагментов. Таким образом, ФН представляется одним из специальных «приспособлений», с помощью которого природа связала в единое целое две системы: иммуногенез и гемостаз [6, 7].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка дополнительных критериев лабораторной диагностики системной красной волчанки с использованием технологии иммунохимического исследования на основе иммобилизированной формы ФН с магнитными свойствами.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование было включено 48 пациентов с системной красной волчанкой. Все пациенты были в возрасте от 18 до 65 лет с продолжительностью заболевания от 3 до 24 лет и находились на стационарном лечении в специализированном отделении ГБУЗ «ГКБ СМП № 25» г. Волгограда, исследованы при наличии

информированного согласия и подтвержденного диагноза СКВ. Верификацию диагноза осуществляли согласно данным критериям ACR 1997 г. Оценка активности данного заболевания проводилась с использованием шкалы ECLAM. Среднее значение индекса ECLAM у пациентов с СКВ составило $10,2 \pm 6,7$ (диапазон значений от 2 до 28) балла. В контрольную группу были включены 30 практически здоровых лиц, прошедших тщательное медицинское обследование. Исходным антигеном явился коммерческий препарат Фибронектин плазменный очищенный лиофильно высушенный человеческий производства Sigma-Aldrich. Для выявления антител к ФН у пациентов с СКВ и контрольной группы применялся иммуноферментный метод с использованием магнитосорбентов (МС). Благодаря научным изысканиям в иммунодиагностике ревматических заболеваний было выявлено, что именно иммуноферментный метод анализа (ИФА) с использованием магнитоуправляемых сорбентов способствует повышению стабильности иммобилизованного антигена. За счет иммобилизации биологически активных веществ в поверхностном слое гранулы и происходит повышение концентрации данного антигена в реакционной зоне, что приводит к увеличению чувствительности данного метода. В свою очередь, включение магнитного материала в гранулы приводит к ускорению всех манипуляций исследования, что способствует улучшению качественной характеристики проведенных исследований. Для получения иммобилизированной формы ФН использовали его раствор с концентрацией 100 мкг/л. Так как ФН имеет высокую молекулярную массу (440 кДа), иммобилизацию проводили методом эмульсионной полимеризации в потоке газообразного азота с включением магнитного материала в модификации И.П. Гонтаря с соавт. [8]. В органическую фазу при нагревании до $+90^\circ\text{C}$ вносили эмульгатор, гидрофильные частицы окиси железа, после перемешивания переносили в охлажденную до $+4^\circ\text{C}$ органическую среду с последующим добавлением мономеров геля с фибронектином. Таким образом получали на поверхности инертной железосодержащей гранулы реакционно активный слой с концентрированным антигеном. Концентрация антигена в гранулах составила 25 мкг/мл. Полученные частицы были правильной сферической формы с диаметром 10–100 мкм.

Результаты оценивали в единицах оптической плотности (е. о. п.) и считали положительными при превышении величин экстинции, найденных для здоровых лиц, более чем на 2 стандартных отклонения (s). Для статистической обработки данных применяли программу Statsoft Statistica 10.0. Статистически значимым считали наличие значений $p < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У 48 обследованных пациентов с СКВ содержание общего ФН плазмы составило в среднем $643,28 \pm 38,41$ мкг/мл, что было достоверно выше аналогичного показателя у здоровых лиц ($p < 0,05$). Концентрация плазменного ФН, превышающая нормальные значения, была выявлена у 31 пациента с СКВ (64,5%). Антитела к ФН были обнаружены у 27 (56,2%) пациентов с СКВ. Их уровень достоверно превышал аналогичный показатель в группе здоровых лиц ($p < 0,001$).

Было выявлено, что в группах пациентов с разной степенью активности проявления заболевания уровень АТ к ФН достоверно выше аналогичного показателя у доноров ($p < 0,05$). Наблюдаются также и различия между содержанием исследуемых

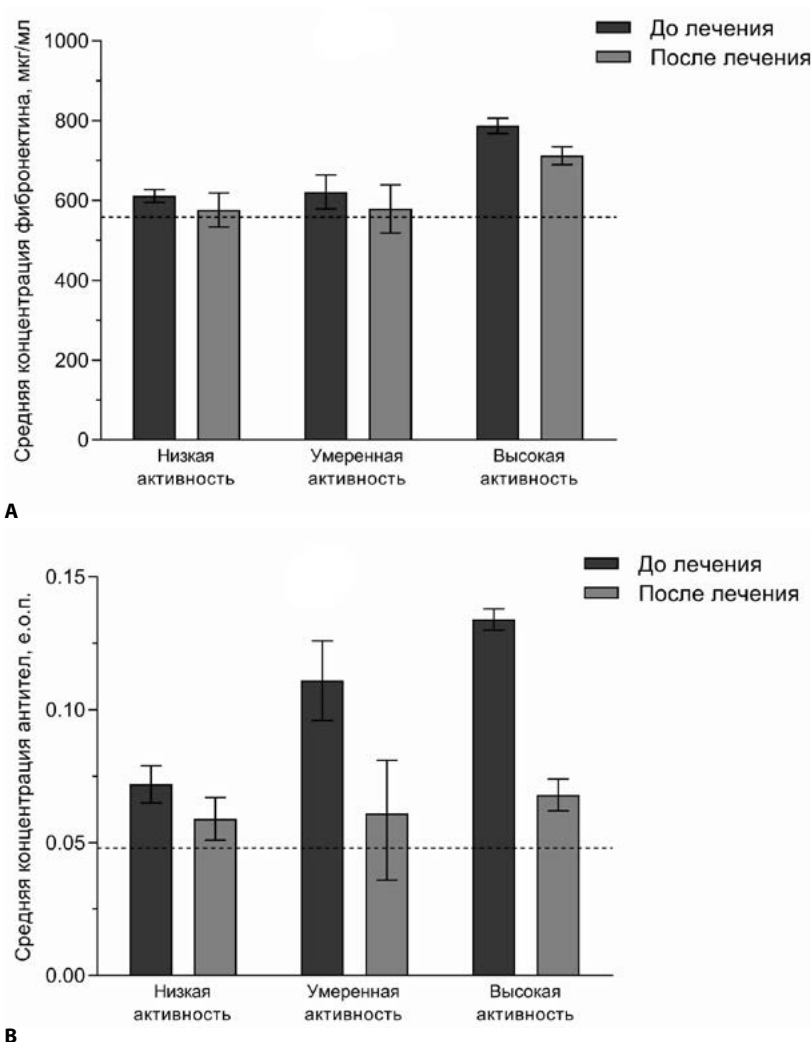


Рис. 1. Концентрация ФН (А) и антител к ФН (В) у пациентов с СКВ в зависимости от активности патологического процесса. Показаны средние арифметические и 95% ДИ, пунктиром обозначены верхние границы референтных интервалов
Fig. 1. FN (A) and anti-FN antibodies (B) levels in patients with SLE depending on pathologic process activity. Arithmetical means and 95% CIs are given; dotted line indicates upper limits of reference intervals

АТ и у пациентов с СКВ с низкой, умеренной и высокой степенью активности ($p < 0,05$) (рис. 1).

Очевидно, что рост уровня АТ к ФН с повышением активности СКВ происходит за счет поликлональной В-клеточной активации, которая является частью генерализованного процесса гиперпродукции аутоантител. Обнаруженная нами корреляция между количеством иммунореактивного ФН и уровнем АТ к нему при максимальной

степени активности патологического процесса при СКВ объясняется включением механизмов обратной связи, которые стимулируют образование большего количества ФН в ответ на гиперпродукцию специфических аутоантител. Однако даже повышенный синтез данного гликопротеина не предотвращает последствий его функциональной недостаточности.

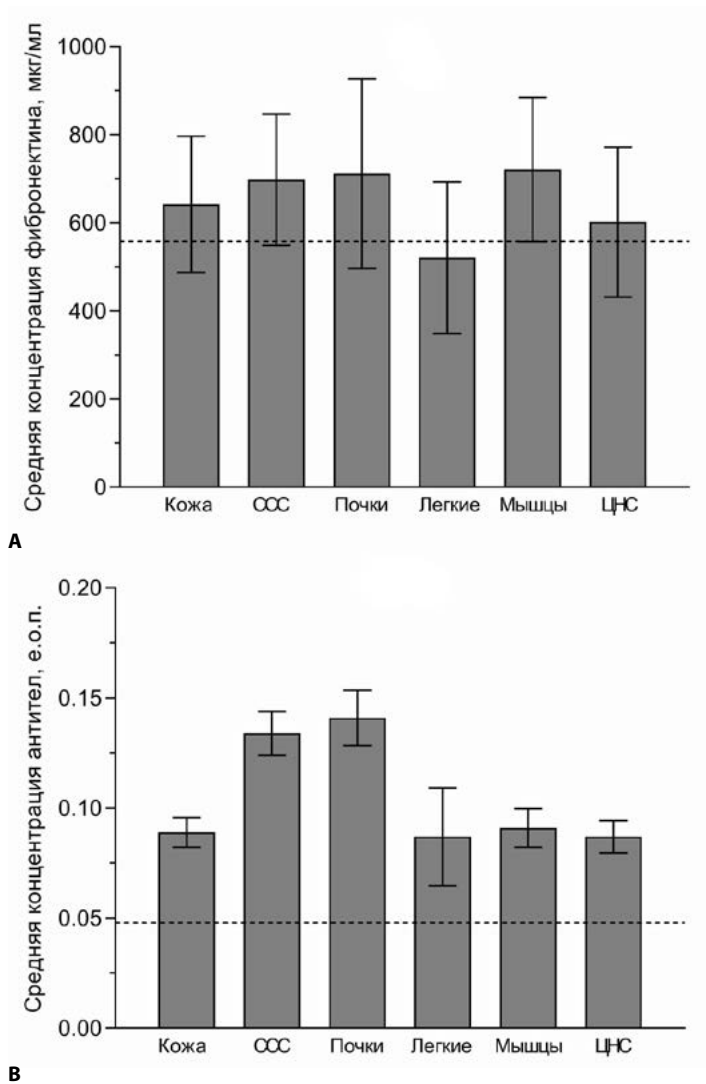


Рис. 2. Концентрация ФН (А) и АТ к ФН (В) у пациентов с различными клиническими проявлениями СКВ. Показаны средние арифметические и 95% ДИ, пунктиром обозначены верхние границы референтных интервалов

Fig. 2. FN (A) and anti-FN antibodies (B) levels in in SLE patients with various clinical manifestations. Arithmetical means and 95% CIs are given; dotted line indicates upper limits of reference intervals



Содержание ФН и АТ к ФН у пациентов с СКВ в зависимости от характера течения заболевания
FN and anti-FN antibodies levels in patients with SLE depending on the nature of the disease course

Течение	Количество пациентов	Количество ФН, мкг/мл	АТ к ФН, е. о. п.
Хроническое	14	541,43±31,25*	0,073±0,008*.*
Подострое	31	567,05±54,12*	0,110±0,009*.*
Острое	3	798,34±32,53*.*	0,134±0,011*.*

Примечания: * достоверные различия с группой доноров ($p<0,05$); * достоверные различия между клиническими группами ($p<0,05$).

Среди обследованных пациентов с СКВ было 14 человек с хроническим, 31 – с подострым и 3 – с острым течением заболевания. При анализе полученных результатов было выявлено, что уровень общего ФН плазмы был повышен во всех исследуемых группах по сравнению с таковым у доноров. При остром течении СКВ (см. таблицу) содержание плазменного ФН достоверно превышало таковое в группах пациентов с хроническим и подострым течением заболевания ($p<0,05$). При хроническом течении СКВ уровень АТ к ФН был выше, чем в контрольной группе ($p<0,05$), а у пациентов с подострым течением убедительно превосходил аналогичные показатели пациентов с хроническим вариантом течения СКВ ($p<0,05$). Острое течение заболевания характеризовалось значительным повышением уровня АТ к ФН по сравнению с их содержанием в группе доноров ($p<0,05$). В процессе проводимого лечения уровень специфических АТ к ФН резко снижался.

В результате проведенных нами исследований была выявлена связь между содержанием ФН и АТ к нему у пациентов с СКВ и поражением органов и систем (рис. 2). Антителообразование к ФН можно рассматривать как предиктор поражения того или иного органа или системы. Нами были выявлены определенные зависимости между степенью поражения тех или иных органов у пациентов с СКВ с повышенными титрами АТ к ФН. Максимальный уровень исследуемых АТ наблюдался при СКВ, сопровождаемой поражением почек и сердечно-сосудистой системы: он статистически достоверно превосходил аналогичные показатели пациентов с другими висцеральными проявлениями ($p<0,05$).

Сосудистое повреждение, которое имеет быть при СКВ, по-видимому, связано с отложением ФН-содержащих иммунных комплексов и снижением антитромботической функции ФН, обусловленным конформационными изменениями молекулы и блокадой его активных центров антителами.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты выполненного исследования позволяют полагать, что повышение концентрации сывороточных АТ к ФН при СКВ является следствием генерализованной гиперпродукции антител, интенсивность которой растет пропорционально степени активности заболевания. Нарушение антитромботических функций ФН в результате блокады активных центров молекулы антителами может способствовать развитию и прогрессированию сосудистой патологии (коронаритов и церебральных васкулитов) при СКВ. Таким образом, мониторинг АТ к ФН с проявлением свойств магнитосорбентов целесообразно использовать для повышения эффективности диагностики СКВ и прогнозирования клинического варианта течения заболевания.

■ ЛИТЕРАТУРА/ REFERENCES

1. Muminov T.A. Fibronectins: structure, functions, possible applied aspects. *Pat. physiology and experimental therapy*. 1985;(6):82–87. (in Russian)
2. Drannik G.N., Romanenko A.M., Yena Ya.M. Biological properties and clinical significance of plasma fibronectin. *Medical business*. 1988;(3):102–106. (in Russian)
3. Yena Ya.M., Konopleva L.F., Chayalo A.A., Sushko E.A., Shekhter I.E. Clinical value of fibronectin determination in internal diseases. *Clinical Medicine*. 1991;(2):24–30. (in Russian)
4. Zhuravleva N.V., Samoilova L.V., Karzakova L.M., et al. Systemic lupus erythematosus is still a problem for doctors. *Problems of reproduction*. 2021;27(1):102–107. doi: 10.17116/repro202127011102. (in Russian)
5. Panafidina T.A., Popkova T.V., Aseeva E.A., Lila A.M. Modern approach in the diagnosis and treatment of systemic lupus erythematosus. *Dr. Ru*. 2021;(7):40–50. doi: 10.31550/1727-2378-2021-20-7-40-50. (in Russian)
6. Shirai T, Fujii H, Ono M, et al. A novel autoantibody against fibronectin leucine-rich transmembrane protein 2 expressed on the endothelial cell surface identified by retroviral vector system in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(4):157. doi: 10.1186/ar3897
7. Yung S., Ng C.Y.C., Ho S.K., et al. Anti-dsDNA antibody induces soluble fibronectin secretion by proximal renal tubular epithelial cells and downstream increase of TGF- β 1 and collagen synthesis. *Autoimmun*. 2015;(58):111–122. doi: 10.1016/j.jaut.2015.01.008
8. Zborovsky A.B., Gontar I.P. Prospects for the use of magnetosorbents in the immunodiagnosis and treatment of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Clinical medicine*. 2001;79(2):42–45. (in Russian)