

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Гонтарь И.П.¹, Емельянова О.И.¹, Русанова О.А.¹, Зборовская И.А.¹, Емельянов Н.И.²

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЕМЫ МОДИФИКАЦИИ ЛИПИДНЫХ АНТИГЕНОВ ДЛЯ СИНТЕЗА ДИАГНОСТИЧЕСКИХ И ЛЕЧЕБНЫХ ПРЕПАРАТОВ В РЕВМАТОЛОГИИ

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А.Б. Зборовского», 400138, Волгоград, Россия;

² Волгоградский государственный медицинский университет, 400131, Волгоград, Россия

*Цель исследования – повышение сорбционной емкости диагностикумов на основе кардиолипинового антигена при антифосфолипидном синдроме у больных системной красной волчанкой методом эмульсионной полимеризации. На основе интеграции антигенных нанообъектов, нами были созданы и апробированы иммобилизованные магнитоуправляемые антигенные наносистемы (АНС). Они представляют собой полиакриламидные гранулы с включенным в их структуру биополимером. Для получения стабильных иммобилизованных биопрепаратов многократного применения с заданными свойствами (формой, диаметром частиц, размером пор, плотностью), в качестве диагностикумов, мы применяли в качестве носителя полиакриламидный гель. Этот способ позволил существенно увеличить сорбционную емкость, сохранить антиген в максимально нативном состоянии и открыл возможности контролируемого модифицирования и синтеза нанообъектов. По описанной выше методике была произведена сорбция антикардиолипиновых антител из плазмы крови больных СКВ с клиническими проявлениями антифосфолипидного синдрома. В качестве контроля использовались сыворотки крови 10 практически здоровых лиц. Уровень антител к кардиолипину (АТ к КЛ) определяли до и после сорбции непрямым твердофазным иммуноферментным методом с использованием иммобилизованных гранулированных препаратов. Было отмечено достоверное влияние на степень повышения антикардиолипиновых антител (АКА) наличия основных клинических критериев АФС (акушерская патология, венозный тромбоз), которые и были использованы в качестве диагностических критериев АФС у больных СКВ. У всех больных СКВ с признаками АФС уровень антител к кардиолипину был достоверно выше по сравнению с группой больных СКВ без признаков АФС и составил в среднем $(0,365 \pm 0,026$ и $0,075 \pm 0,003$, соответствии $p < 0,001$). Полученные нами АНС на основе иммобилизованного кардиолипина в условиях *in vitro* эффективно удаляли АТ к КЛ из цельной крови больных СКВ с клиническими проявлениями АФС до уровня здоровых лиц (до сорбции АТ к КЛ- $0,328 \pm 0,0289$; после сорбции- $0,059 \pm 0,0170$, $p < 0,001$; сорбционная емкость- $8,00 \pm 0,390$ мг/мл). Метод эмульсионной полимеризации с учетом гидрофобных и гидрофильных свойств молекул липидов позволяет контролируемым образом синтезировать и модифицировать биомолекулы с последующим получением новых диагностических и лечебных препаратов.*

Ключевые слова: антифосфолипидный синдром; кардиолипин; магнитосорбент.

Для цитирования: Гонтарь И.П., Емельянова О.И., Русанова О.А., Зборовская И.А., Емельянов Н.И. Технологические приемы модификации липидных антигенов для синтеза диагностических и лечебных препаратов в ревматологии. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (10): 603-606. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-10-603-606>

Gontar I.P.¹, Emelyanova O.I.¹, Rusanova O.A.¹, Zborovskaya I.A.¹, Emelyanov N.I.²

TECHNIQUES OF MODIFYING LIPID ANTIGENS FOR SYNTHESIS OF DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC PREPARATIONS IN RHEUMATOLOGY

¹FSBI «RICER named after A.B. Zborovskiy» Russia;

²FSBEI HE VolgSMU MOH Russia

The objective of the study is to enhance sorption capacity of diagnostic agents by using cardiolipin antigens for antiphospholipid syndrome in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). A technique of emulsion polymerization was used. Having integrated antigen nanoobjects we developed immobilized magnetocontrollable antigen nanosystems and put them to an evaluation test. The nanosystems are polyacrylamide granules with a built in antigen. To obtain stable immobilized multi-use biopharmaceuticals with targeted properties (shape, particle diameter, pore size, density) we used a modified version of emulsion polymerization method using polyacrylamide carrier gel. This method permitted a greater sorptive capacity, preserving the antigen in maximum native state, and opened up the possibility of controllable modification of nanoobjects. Cardiolipin was used as the antigen in question. Following the method described above we performed sorption of anticardiolipin antibodies from blood plasma of SLE patients who showed clinical presentations of antiphospholipid syndrome. All SLE patients with signs of antiphospholipid syndrome showed reliably higher levels of cardiolipin antibodies compared with SLE patients without antiphospholipid syndrome signs; the antibody level was 0.365 ± 0.026 and 0.075 ± 0.003 on average, correspondingly ($p < 0.001$). Blood serum from 10 apparently healthy individuals served as control. The level of cardiolipin antibodies was determined before and after sorption by indirect solid phase immunoenzyme method. In the eluate we estimated total protein by Lowry method. In vitro testing showed that the obtained antigen nanosystems based on immobilized cardiolipin could effectively remove cardiolipin antibodies from whole blood of SLE patients with clinical presentations of APS to achieve the values of healthy individuals (before sorption cardiolipin antibodies $0.328 \pm$

0.0289; after sorption 0.059 ± 0.0170 ; $p < 0,001$; sorption capacity 8.00 ± 0.390 mg/ml). The method of emulsion polymerization with consideration to hydrophobic and hydrophilic properties of lipid molecules permits obtaining and modifying biomolecules with certain properties, in a controlled fashion.

Key words: antiphospholipid syndrome; cardiolipin; magnetocontrolable sorbent.

For citation: Gontar I.P., Emelyanova O.I., Rusanova O.A., Zborovskay I.A., Emelyanov N.I. Techniques of modifying lipid antigens for synthesis of diagnostic and therapeutic preparations in rheumatology. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (10): 603-606. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-10-603-606>

For correspondence: Emelyanova Oiga Ivanovna, Candidate of Medical Sciences, Leading Researcher); e-mail: emelyanova.vlg@mail.ru

Information about authors:

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

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

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

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

Emelyanov N.I. <https://orcid.org/0000-0001-5940-9140>

Conflict of interests. The authors declare the absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 19.01.2019
Accepted 22.04.2019

Введение. Современный этап развития науки характеризуется высоким темпом роста нанотехнологий с использованием веществ и материалов размером от нескольких десятков до сотен нанометров. Правительством Российской Федерации были утверждены требования к продуктам nanoиндустрии (распоряжение от 7 июля 2011 г. № 1192-р). Одной из таких сфер применения нанотехнологической продукции и является создание медицинских препаратов, предназначенных для диагностики и лечения ревматических заболеваний.

Ревматические заболевания представляют собой хронический вялотекущий процесс, для которых характерно большое разнообразие форм и вариабельность темпов прогрессирования. По социально-экономическим последствиям системная красная волчанка занимает первое место в группе системных поражений соединительной ткани ввиду ее широкого распространения среди населения разных стран, преимущественного поражения лиц трудоспособного возраста и с высокой инвалидизацией. Наиболее частой причиной летальности и развития стойкой нетрудоспособности при данной патологии являются Lupus-нефрит и Lupus-ЦНС, сопровождающиеся множественными поражениями внутренних органов. Антитела к нативной ДНК и фосфолипидным антигенам обуславливают развитие соответственно волчаночного гломерулонефрита и антифосфолипидного синдрома (АФС), включающего рецидивирующие артериальные и венозные тромбозы, эмболии, поражение нервной системы, акушерскую патологию. Данные проявления часто выходят на ведущее место в клинической картине заболевания, определяя его тяжесть и неблагоприятный прогноз. Так, антитела к кардиолипину обуславливают развитие субтипа системной волчанки с признаками АФС, при котором часто невозможно подавить активность заболевания традиционными средствами базисной терапии, в связи с чем и возникает необходимость изучения этих патогенетических иммунологических процессов. Обнаружение в сыворотке крови различных аутоантител может иметь большое диагностическое значение. Кроме того, такие антитела обладают значительным патогенным действием, их уда-

ление из организма оказывает благоприятное лечебное воздействие на течение основного заболевания [1].

На основе интеграции антигенных нанообъектов, нами были созданы и апробированы иммобилизованные магнитоуправляемые антигенные наносистемы (АНС). Они представляют собой полиакриламидные гранулы с включенным в их структуру антигеном.

Нанообъектами мы называем химические группы, которые формируют активные центры ферментов, антигенные детерминанты, клеточные рецепторы и т.д. Наиболее интересным в этом отношении нам представляется, как модель, антигенный препарат – кардиолипин, который относится к фосфолипидам.

Данные рентгеноструктурного анализа показывают, что молекулы фосфолипидов имеют форму сплюснутого с боков цилиндра, а по длине как бы делятся на две неравные части, небольшую «головку», состоящую из полярных групп, и длинный «хвост», образованный углеводородными цепями жирных кислот, входящих в состав фосфолипида. Именно такое строение молекулы приводит к тому, что в водных растворах фосфолипидные молекулы самособираются в бислойную мембрану. В мембране «липидные хвосты» (гидрофобные участки) упрятаны внутрь, а снаружи в контакте с водным окружением оказываются полярные «головы» (гидрофильные участки) этих молекул.

Основные фосфолипиды мембран – фосфотидилсерин, фосфотидилинозитол, фосфотидилэтаноламин, фосфотидилхолин, кардиолипин.

Кардиолипин – фосфолипид, структурный компонент внутренней мембраны клетки и митохондрий, построенный на основе глицерола и остатков фосфотидной кислоты. Кардиолипин может обладать антигенными свойствами, они заключены в гидрофильной части молекулы, а не в гидрофобной его части.

Размер молекулы кардиолипина равен $0,4414$ нм³, примерно такой же размер и выше перечисленных фосфолипидов, что соответствует определению нанообъектов как частиц менее 100 нм.

Для получения стабильных иммобилизованных биопрепаратов многократного применения с заданными

Таблица 1

Потери кардиолипина при иммобилизации

Концентрация кардиолипина в растворе, мг	Иммобилизованный кардиолипин, мг M±m	Потери кардиолипина, мг M±m	Эффективность иммобилизации, %
28	23,6±0,63	4,4±0,67	84,2%
24	20,6±0,83	3,4±0,78	85,8%
20	17,4±0,68	2,6±0,86	87,1%
16	13,6±0,69	2,4±0,83	85%
12	10,2±0,67	1,8±0,86	85%

Таблица 2

Контроль специфичности сорбента

Время, мин	Общий белок, мг/мл	IgG, мг/мл	IgA, мг/мл	IgM, мг/мл
Исходный фон	73	10,5	1,3	1,25
15	75	11,8	1,2	1,25
30	72	9,90	1,36	1,25
45	71	10,9	1,28	1,04
60	75	11,9	1,27	1,02

свойствами (формой, диаметром частиц, размером пор, плотностью), мы использовали метод эмульсионной полимеризации в нашей модификации с использованием полиакриламидного геля в качестве носителя. Этот метод позволил существенно увеличить сорбционную емкость, сохранить антиген в максимально нативном состоянии и открыл возможности контролируемого модифицирования нанообъектов [6].

Цель исследования - повышение сорбционной емкости диагностикумов на основе кардиолипинового антигена при АФС у больных системной красной волчанкой методом эмульсионной полимеризации.

Материал и методы. Исследование проводили в соответствии с принципами Хельсинской декларации Международной медицинской ассоциации, что подтверждено результатами экспертизы Регионального этического комитета. Исследования осуществляли при наличии информированного согласия пациентов. Диагноз АФС был подтвержден с помощью критериев Hughes и Harris [8], верификация диагноза красная волчанка выполнялась с помощью критериев ACR [9].

Кардиолипиновый иммуносорбент получали путем связывания полиакриламидного носителя с антигеном, смешанным с раствором полиметилметакрилата в хлороформе в соотношении 1:1 и выделения целевого продукта, в качестве носителя использовали гранулированный полиакриламидный гель с концентрацией поперечносшивающего агента 25% и с включением в него 10%-ным оксидом железа [3,4] (табл. 1).

Используя различия гидрофобных и гидрофильных частей молекулы кардиолипина и наш метод иммобилизации с использованием полиакриламидного геля в качестве носителя, можно получать стабильные, пространственно-ориентированные, гранулированные с магнитными свойствами нанообъекты, с последующим применением их в диагностике и лечении больных ревматическими заболеваниями [2,5-7].

Результаты и обсуждение. Нами был проведен сравнительный анализ классического ИФА и ИФА с ис-

пользованием иммобилизованных гранулированных препаратов, полученных нашим способом. Использование иммобилизованного гранулированного кардиолипина, в предложенном нами варианте ИФА, и раствора кардиолипина в традиционном твердофазном ИФА для фосфолипидов показало, что максимальное значение экстинкции с одинаковым рабочим разведением пула сывороток было 0,280±0,033 мг в классическом варианте и 0,342±0,027 мг в нашей модификации. Минимальные положительные значения экстинкции в традиционном методе соответствовали разведению пула сывороток 1,800, а с использованием иммобилизованных препаратов – 1,6400. Применение иммобилизованной формы кардиолипина в предлагаемом методе позволило увеличить чувствительность ИФА в восемь раз, по сравнению с традиционным методом на полистероловых планшетах.

Было выявлено, что у всех больных СКВ с признаками АФС уровень антител к кардиолипину был достоверно выше по сравнению с группой больных СКВ без признаков АФС и составил в среднем (0,365±0,026 и 0,075±0,003, $p<0,001$) при использовании нашей модификации.

Особый интерес представляют данные о зависимости уровня антител к кардиолипину от наличия поражения центральной нервной системы. У больных с синдромом Снеддона уровень антикардиолипиновых антител был достоверно выше, чем у больных без данного синдрома (0,489±0,094 и 0,171±0,049, $p<0,001$).

По описанной выше методике была произведена и сорбция антикардиолипиновых антител из плазмы крови больных СКВ с клиническими проявлениями антифосфолипидного синдрома. В качестве контроля использовались сыворотки крови 10 практически здоровых лиц. Уровень антител к кардиолипину определяли до и после сорбции непрямым твердофазным иммуноферментным методом. В элюате измеряли концентрацию общего белка по Лоури. Полученные нами АНС на основе иммобилизованного кардиолипина в условиях *in vitro* эффективно удаляли АТ к КЛ из цельной крови больных

СКВ с клиническими проявлениями АФС до уровня здоровых лиц (до сорбции АТ к КЛ-0,328±0,028; после сорбции-0,059±0,017, $p < 0,001$; сорбционная емкость-8,00±0,390 мг/мл).

Контроль специфичности сорбента определяли путем смешивания 1 г гранул с 4 мл сыворотки крови донора на магнитной мешалке с интервалом 15 мин, в ней определяли концентрацию белка по Лоури, иммуноглобулинов по Манчини классов G, A, M. Результаты приведены в табл. 2.

Заключение. Метод эмульсионной полимеризации с учетом гидрофобных и гидрофильных свойств молекул липидов позволяет контролируемым образом получать и модифицировать биомолекулы с характерными свойствами. Этот метод дает возможность придать химическим группам нанообъектов, входящим в активные центры ферментов, антигенных детерминант, клеточных рецепторов и токсинов, принципиально новые качества и осуществлять их интеграцию в полноценно функционирующие системы большего масштаба, коими и являются иммобилизованные гранулированные антигенные препараты (ИГАП). Поэтому такие биологические структуры можно считать полноценными нанообъектами и использовать их и в диагностике, и в лечении ревматологических больных.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александров А.В., Шилова Л.Н., Емельянов Н.Н., Алехина И.Ю., Парамонова О.В., Новикова О.В., Макарова Т.С., Емельянов Н.И., Курбанова Р.Д., Емельянова О.И. Иммунопатогенетические аспекты современной лабораторной диагностики системной красной волчанки, системной склеродермии и ювенильного ревматоидного артрита. *Международный журнал по иммунореабилитации*. 2010; 12(2): 150.
2. Зборовский А.Б., Гонтарь И.П., Александров А.В., Алехина И.Ю., Трофименко А.С. Возможности исследования иммобилизованных наносистем в ревматологии. *Доктор Ру* 2009; (3): 53-4.
3. Гонтарь И.П., Зборовский А.Б., Левкин С.В. Способ получения иммобилизованного кардиолипинового антигена для определения специфических антител. Патент на изобретение РФ № 1649807; 1993.
4. Гонтарь И.П., Зборовский А.Б., Левкин С.В., Сычева Г.Ф. Способ получения магнитных полиакриламидных гранул. Патент на изобретение РФ № 1582657; 1993.
5. Гонтарь И.П., Емельянова О.И., Парамонова О.В., Маслакова Л.А., Трофименко А.С. Магнитные сорбенты в экстракорпоральной терапии у больных системной красной волчанкой с антифосфолипидным синдромом. *Патогенез*. 2016; 14(3): 42-3.
6. Александров А.В., Гонтарь И.П., Алехина И.Ю., Зборовский А.Б. Перспективы применения антигенных наносистем в диагностике и лечении воспалительных ревматических заболеваний. *Терапевтический архив* 2009; (12): 48-4.
7. Зборовский А.Б., Гонтарь И.П., Александров А.В. Иммобилизованные нанообъектные системы на основе кардиолипина в диагностике и лечении воспалительных ревматических заболеваний. Материалы III национального конгресса терапевтов «Новый курс консолидации усилий по охране здоровья нации» Москва 5-7 ноября 2008. М.: «Бионика» 2008; 94-1.
8. Hughes G.R.V., Harris E.N., Gharavi A.E. The Anticardiolipin Syndrome. *J. Rheum.* 1986; 13: 486-9.
9. Hochberg M.C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997; 40: 1728.

REFERENCES

1. Aleksandrov A.V., Shilova L.N., Emel'janov N.N., Alehina I.Ju., Paramonova O.V., Novikova O.V., Makarova T.S., Emel'janov N.I., Kurbanova R.D., Emel'janova O.I. Immunopathogenetic aspects of modern laboratory diagnosis of systemic lupus erythematosus, systemic scleroderma and juvenile rheumatoid arthritis. *Mezhdunarodnyi zhurnal po immunoreabilitatsii*. 2010; 12 (2): 150. (in Russian)
2. Zborovskij A.B., Gontar' I.P., Aleksandrov A.V., Alehina I.Ju., Trofimenko A.S. Opportunities for the study of immobilized nanosystems in rheumatology. *Doctor Ru*. 2009; (3): 53-4. (in Russian)
3. Gontar' I.P., Zborovskij A.B., Levkin S.V. The method of obtaining immobilized cardiolipin antigen for the determination of specific antibodies. Patent RF No 1649807; 1993. (in Russian)
4. Gontar' I.P., Zborovskij A.B., Levkin S.V., Sycheva G.F. The method of obtaining magnetic polyacrylamide granules. Patent RF No. 1582657; 1993. (in Russian)
5. Gontar' I.P., Emel'janova O.I., Paramonova O.V., Maslakova L.A., Trofimenko A.S. Magnetic sorbents in extracorporeal therapy in patients with systemic lupus erythematosus with antiphospholipid syndrome. *Patogenez*. 2016; 14 (3): 42-3. (in Russian)
6. Aleksandrov A.V., Gontar' I.P., Alehina I.Ju., Zborovskij A.B. Prospects for the use of antigen nanosystems in the diagnosis and treatment of inflammatory rheumatic diseases. *Tерапевтический архив*. 2009; (12): 48-4. (in Russian)
7. Zborovskij A.B., Gontar' I.P., Aleksandrov A.V. Immobilized nano-object systems based on cardiolipin in the diagnosis and treatment of inflammatory rheumatic diseases. Proceedings of the III National Congress of Therapists "New Course in the Consolidation of Efforts to Protect the Health of the Nation" Moscow November 5-7, 2008. Moscow: Bionika; 2008; 94-1. (in Russian)
8. Hughes G.R.V., Harris E.N., Gharavi A.E. The Anticardiolipin Syndrome. *J. Rheum.* 1986; 13: 486-9.
9. Hochberg M.C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997; 40: 1728.

Поступила 19.01.19

Принята к печати 22.04.19