

УДК 616.94+616.72-002

## Получение и характеристика антител к цитруллинированной аденозиндезаминазе при ревматоидном артрите

Л.Г. Карапетян

*Институт биохимии им. Г.Х. Бунятына НАН РА  
0014, Ереван, ул. П.Севака, 5/1*

*Ключевые слова:* ревматоидный артрит, синовиальная жидкость, цитруллинированная аденозиндезаминаза, аутоантителы, аутоантитела

Ревматоидный артрит (РА) является хроническим системным аутоиммунным заболеванием, которое характеризуется инфильтрацией воспалительных клеток в синовиальную ткань. В результате хронического синовита (синовиального воспаления) наблюдается прогрессирующее разрушение суставов [12]. Ранняя диагностика этого заболевания может способствовать более эффективной терапии. Новые биологические маркеры могут быть индикаторами как активности, так и прогрессирования заболевания [7]. Несколько типов аутоантител, включая ревматоидный фактор [5], антитела против цитруллинированных протеинов (АЦПА) [4] и антитела против карбамилированных белков [13], имеют большую ценность для диагностики РА и определения степени его тяжести. Различные комбинации биологических маркеров используются для улучшения клинической диагностики РА.

При цитруллинировании белков происходит трансформация остатков аргинина в цитруллин, которая приводит к изменению заряда белка, его изоэлектрической точки, размера и конформации, а это, в свою очередь, влияет на его способность к образованию как внутримолекулярных, так и межмолекулярных ионных и водородных связей [8]. Цитруллинированные белки обнаруживаются при заболеваниях аутоиммунной природы, таких как РА, рассеянный склероз, оптическая глаукома и т. д. [3]. При РА была показана также причастность цитруллинированных белков к индуцированию воспалительных процессов в суставах. Вследствие этого некоторые из этих белков и антитела к ним рассматриваются в качестве ключевых маркеров для раннего распознавания и изучения патофизиологии РА. Они могут рассматриваться также в качестве мишеней в

терапии. Цитруллинированные белки и антитела к ним образуют иммунные комплексы, повышение уровня которых, в конечном итоге, приводит к хроническому воспалению, характерному для РА [16]. В настоящее время для РА показана специфичность цитруллинирования нескольких белков, включая  $\alpha$ -енолазу, кератин, фибриноген, фибронектин, коллаген и виментин, а антитела к ним признаны в качестве маркеров этого заболевания.

Идентификация цитруллинированных белков в качестве аутоантигенов и разработка новых методов анализа, основанных на обнаружении новых цитруллинированных белков, стали крупным прорывом в лабораторной диагностике в ревматологии. Ожидается, что семейство антител к цитруллинированным белкам расширится, поскольку возрастает потребность в разработке новых стратегий в лечении.

Аденозиндезаминаза (АДА, Ф.К. 3.5.4.4) (36-42кДа) является одним из основных ферментов пуринового обмена, представленным во всех тканях млекопитающих. Фермент катализирует необратимое гидролитическое дезаминирование (дезоксидация) аденозина в (дезоксидинозин) [14]. Это превращение является начальным этапом серии реакций, ответственных за пролиферацию и дифференциацию лимфоцитов. В число многочисленных функций АДА входит обеспечение пролиферации и созревания клеток лимфоидной ткани, развитие клеточного иммунитета и лимфоидной системы [6]. Повышение активности АДА наблюдается при разных патологиях: туберкулезе (лимфоцитарный выпот при различных его формах), новообразованиях, сахарном диабете и т.д. Это свидетельствует о том, что высокая активность АДА косвенно связана с подмножествами Т-лимфоцитов, участвующих в воспалительных процессах [9]. Имеется ряд исследований, посвященных применению активности АДА (АДА-тест) в дифференциальной диагностике суставных заболеваний. Для населения Армении пороговое значение активности АДА для дифференцирования РА и остеоартрита было оценено в нашей лаборатории и равно 12МЕ/л ( $p < 0,0001$ ) [2].

В настоящее время тест на обнаружение аутоантител против циклических цитруллинированных пептидов, имеющий высокое прогностическое значение для ранней диагностики РА, является основным достижением в ревматологии. В связи с этим вполне вероятно, что анализ синовиальной жидкости может стать полезным для более целенаправленного исследования и дифференциальной диагностики артритов.

В этом плане получение антител к цитруллинированной АДА может быть инструментом для выявления фермента в различных биологических жидкостях, а также их возможного участия в патогенезе заболевания.

В данной работе были получены и методом двойной иммунодиффузии охарактеризованы специфические антитела к цитруллинированной АДА.

## Материал и методы

Образцы синовиальной жидкости (СЖ) больных РА предоставлены Медицинским центром «Мурацан» и хранились при  $-20^{\circ}\text{C}$  до использования.

Реактивы: диацетилмоноксим (ДАМО), тиосемикарбазид (ТСК), аденозин, полный и неполный адьюванты Фрейда и агароза Sigma (USA).

**Получение и активность АДА.** Низкомолекулярная форма АДА была выделена из СЖ больных РА с использованием классических методов гель-фильтрации и ионообменной хроматографии [10]. Активность фермента оценивали фенол-гипохлоритным методом по количеству аммиака, выделенного при катализе реакции дезаминирования аденозина. В качестве стандарта использовали сульфат аммония [1].

Наличие цитруллина в белках оценивали с использованием колориметрического анализа, основанного на специфической реакции ДАМО с уреидной группой при сильноокислых условиях [10].

**Получение антител (IgG фракция) из крови кролика.** С целью получения антител (фракция IgG) к цитруллинированной АДА (АДА<sub>ЦТ</sub>), выделенной из СЖ больных РА, в лимфоидные узлы кролика (1,5кг) трехкратно вводили смесь АДА<sub>ЦТ</sub> (0,45 мг/мл) с полным и неполным адьювантом Фрейда (с соотношением 1:1).

Для первой иммунизации было взято 0,8мл АДА<sub>ЦТ</sub> (0,45 мг/мл) и 0,8мл полного адьюванта Фрейда. На 14-й день ввели смесь, содержащую 0,5мл АДА<sub>ЦТ</sub> (0,45 мг/мл) и 0,5мл неполного адьюванта Фрейда. В третий раз, через 7 дней, иммунизировали кролика той же смесью, что и во второй раз.

На 11-й день после третьей иммунизации взятую кровь из сердца кролика центрифугировали 7 мин при 3000 об/мин. Белки из полученной сыворотки осаждали сульфатом аммония при насыщении 35% (рН~8,0), центрифугированием 20 мин при 6000 об/мин. Образованный осадок растворяли в PBS (0,01М К-На фосфатном буфере, содержащем 0,14 М КСl и 0,14 М NaCl) (рН 7,4) и диализовали против 5mM К-На фосфатного буфера (рН 7,4). IgG по сравнению с другими белками, содержащимися в плазме крови, имеет наиболее высокую щелочную изоэлектрическую точку (рН~8,5), благодаря чему не связывается с DEAE-целлюлозой. С целью выделить фракцию IgG диализат (концентрацию буфера диализата доводили до 20mM) пропускали через колонку с DEAE-целлюлозой, уравновешенной 20mM К-На фосфатным буфером (рН 7,4). Сошедшие белковые фракции хранили в холодильнике при  $4^{\circ}\text{C}$  с добавлением 0,1% азида [11].

Реакцию преципитации методом Ухтерлони проводили в 1,2% агаровом геле, приготовленном на 0,07М К-На фосфатном буфере [15].

Использованные приборы: спектрофотометр Cary 60 (USA), центрифуга BioSan (Latvia).

### Результаты и обсуждение

Низкомолекулярную форму фермента АДА из СЖ пациентов, больных РА, очищали до электрофоретически гомогенного состояния с использованием процедур гель-фильтрации и ионообменной хроматографии, описанных в более ранних работах [10]. В очищенных белках определяли белковое цитруллинирование. Наши исследования показали, что, в отличие от других типов артрита (реактивный артрит, подагра, анкилозирующий спондилоартрит и ювенильный идиопатический артрит), в СЖ пациентов РА при исходных активностях АДА от 40 U/L и выше низкомолекулярная изоформа фермента цитруллинирована (14 мкмоль цитруллина на мкмоль АДА). При этом было показано, что высокомолекулярная форма АДА ни при каких исследованных типах артрита, включая РА, не цитруллинирована [10].

С целью получения антител для иммунизации кролика использовали очищенную АДА<sub>ЦТ</sub> из СЖ больных РА, как описано в разделе «Материал и методы».

Для характеристики полученных антител нами была проведена реакция преципитации между очищенной АДА<sub>ЦТ</sub> и СЖ больных РА, а также АДА<sub>ЦТ</sub> и полученными антителами (IgG) по методу Ухтерлони (рис. 1).

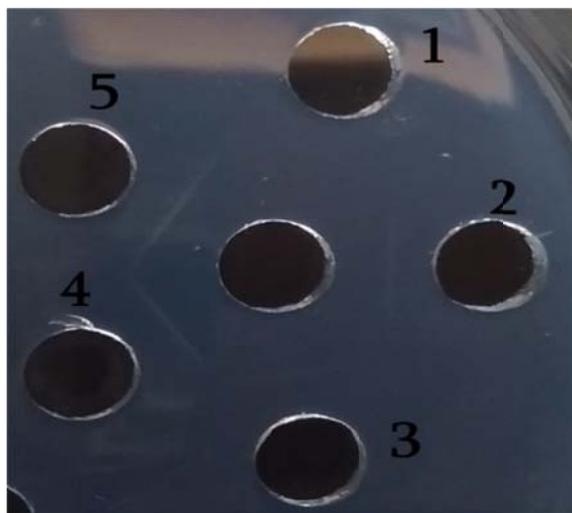


Рис. 1. Реакция преципитации между АДА<sub>ЦТ</sub> и IgG, АДА<sub>ЦТ</sub> и СЖ больных РА (по методу Ухтерлони). Лунки 1,2,5 заполнены IgG с концентрацией 50;100 и 450мкМ соответственно. В лунку 4 внесена СЖ, в 3 – та же СЖ, разбавленная в 10 раз

В центральную лунку внесено 50мкл АДА<sub>ЦТ</sub> 30мкМ (1,075мг/мл). В соседние лунки внесены по 50мкл IgG с исходной концентрацией 67,5 мг/мл (450мкМ) в следующих разбавлениях: лунка 1 – 50мкМ; лунки 2–100мкМ и 5 – 450мкМ. Лунки 4 и 3 заполнены по 50 мкл РА СЖ исходной и разбавленной в 10 раз соответственно (рис. 1).

Результаты, отраженные на рис.1, показывают, что цитруллинированная АДА дает реакцию преципитации в виде линии как с IgG, выделенные из крови кролика, так и с СЖ больных РА, это говорит о том, что синовиальная жидкость содержит антитела к АДА<sub>ЦТ</sub>, идентичные антителам, полученным из крови иммунизированного кролика. Следовательно, можно предположить, что антитела к АДА<sub>ЦТ</sub> могут быть применены в диагностике для выявления модифицированного фермента в биологических жидкостях при РА.

Для характеристики антител титр является важным параметром. Исходя из этого, нами был определен титр антител к АДА<sub>ЦТ</sub> (рис. 2).

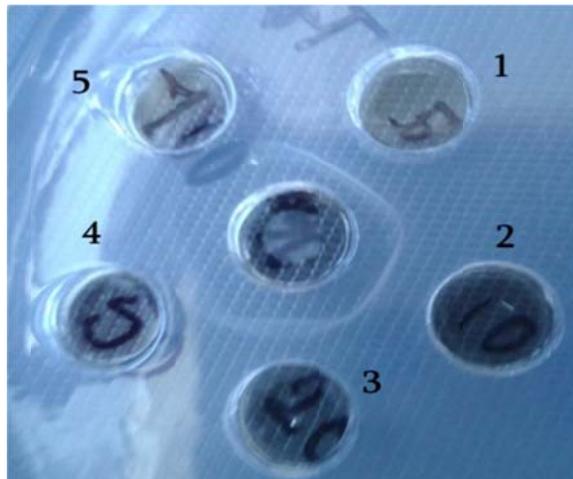


Рис.2. Определение титра IgG. Реакция преципитации между АДА<sub>ЦТ</sub> и IgG (по методу Ухтерлони). Лунки 1,2,3,4 и 5 заполнены IgG в следующих концентрациях: 360; 240; 180; 100 и 60 мкМ соответственно

В центральную лунку внесено 50мкл АДА<sub>ЦТ</sub> (30мкМ, 1,075мг/мл). В лунки 1, 2, 3, 4 и 5 внесены по 50мкл IgG с концентрациями 360; 240; 180; 100 и 60 мкМ соответственно. Исходная концентрация IgG 67,5 мг/мл (450мкМ).

Из полученных результатов можно сделать вывод, что наименьшая концентрация (100мкМ), при которой антитела способны выявить антиген с концентрацией (30мкМ), соответствует титру полученных антител, равному 4,5 (рис. 2).

Полученный результат, а именно обнаружение антител в синовиальной жидкости при РА к цитруллинированной АДА, предполагает, что эта система может участвовать в патогенезе заболевания и, следовательно, быть мишенью при терапии. Кроме того, полученные антитела могут быть использованы в различных форматах иммуноанализа для специфичной и ранней диагностики РА.

*Поступила 13.05.21*

## **Հակամարմինների ստացումն ու բնութագրումը ցիտրուլինացված ադենոզինդեամինազի նկատմամբ ռևմատոիդ արթրիտի դեպքում**

**Լ.Գ. Կարապետյան**

Պեպտիդիլարգինինդեամինազի (ՊԱԴ) ընտանիքի ֆերմենտների ազդեցությամբ սպիտակուցներում հետտրանսլացիոն ձևափոխման արդյունքում արգինինի մնացորդները վերափոխվում են ցիտրուլինի: Ռևմատոլոգիայի կարևորագույն ձեռքբերումներից են արյան պլազմայում ցիտրուլինացված նոր սպիտակուցների՝ որպես աուտոհակածինի բացահայտումը և դրանց նկատմամբ առաջացած հակամարմինների գրանցումը: Այս առումով ցիտրուլինացված նոր սպիտակուցների հայտնաբերումը և հակամարմինների բնութագրումը կարող են ոչ միայն բարձրացնել ախտորոշման արդյունավետությունը, այլև թերապևտիկ կարևոր նշանակություն ունենալ: Այս աշխատանքում ցույց են տրված ռևմատոիդ արթրիտով հիվանդների սինովիալ հեղուկներից անջատված ցիտրուլինացված ադենոզինդեամինազի նկատմամբ հակամարմինների ստացումը և դրանց հնարավոր կիրառումը որպես ախտորոշիչ նոր միջոց:

## **Obtaining and Characterization of Antibodies to Citrullinated Adenosine Deaminase at Rheumatoid Arthritis**

**L.G. Karapetyan**

As a result of post-translational modification by enzymes of the peptidylarginine deiminase family, arginine residues in proteins are converted to citrulline by deamination. One of the most important discoveries in rheumatology is the detection of citrullinated proteins in the blood plasma of patients with rheumatoid arthritis and characterization of anti-citrullinated protein antibodies to them. In this regard discovering of new citrullinated antigens and antibodies toward them could not only increase the specificity of diagnosis, but

also open the new perspectives in therapy. In this work, antibodies from synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis toward citrullinated adenosine deaminase were obtained and characterized with the aim of their possible use as a tool in various immune analyzes for diagnosis of the disease.

### Литература

1. *Antonyan A.A., Haroyan A.A., Harutyunyan R.A., Sharoyan S.G., Mardanyan S.S.* Adenosine deaminase activity in synovial fluid at arthritis. Proceedings of the YSU. Chemistry and Biology, 2013, 3: 28-32.
2. *Antonyan A., Sharoyan S., Haroyan A., Harutyunyan R., Mardanyan S.* Adenosine Deaminase activity in synovial fluid at arthritis. Proceedings of YSU. Chemistry and Biology 3: 2013, 28-32.
3. *Baka Z., Gyorgy B., Geher P., et al.* Citrullination under physiological and pathological conditions. Joint Bone Spine, 79(5): 2012, 431-436.
4. *Bos W.H., Wolbink G.J., Boers M., Tjhuis G.J., de Vries N., van der Horst-Bruinsma I.E., et al.* Arthritis development in patients with arthralgia is strongly associated with anti-citrullinated protein antibody status: a prospective cohort study. Ann Rheum Dis, 2010, 69: 490-4.
5. *Bukhari M., Lunt M., Harrison B.J., Scott D.G., Symmons D.P., Silman A.J.* Rheumatoid factor is the major predictor of increasing severity of radiographic erosions in rheumatoid arthritis: results from the Norfolk Arthritis Register Study, a large inception cohort. Arthritis Rheum, 2002, 46: 906-12.
6. *De Meester I., Vanham G., Kestens L., Vanhoof G., Bosmans E., Gigase P., Scharpe S.* Binding of adenosine deaminase to the lymphocyte surface via CD26. Eur. J. Immunol., 1994, 24: 566-570.
7. *Goronzy J.J., Matteson E.L., Fulbright J.W., Warrington K.J., Chang-Miller A., Hunder G.G., et al.* Prognostic markers of radiographic progression in early rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum., 2004, 50:43-54.
8. *Gyorgy B., Toth E., Tarcsa E., et al.* Citrullination: a posttranslational modification in health and disease. Int. J. Biochem. Cell Biol., 2006, 38(10):1662-1677.
9. *Kameoka J., Tanaka T., Nojima Y., Schlossman S., Morimoto C.* Direct association of adenosine deaminase with T cell activation antigen, CD26. Science 261: 1993;466-469.
10. *Karapetyan L., Sharoyan S., Vardanyan V., Antonyan A., Mardanyan S.* Adenosine deaminase in synovial fluid at rheumatoid arthritis is citrullinated. Journal of Biochemistry and Molecular Biology Research, 2019, 4(1): 225-229.
11. *Mark Page and Robin Thorpe.* Purification of IgG by Precipitation with Sodium Sulfate or Ammonium Sulfate. In book: The Protein Protocols Handbook. February, 2002, DOI: 10.1385/1-59259-169-8:983.
12. *Scott D.L., Wolfe F., Huizinga T.W.* Rheumatoid arthritis. Lancet, 2010, 376: 1094-108.
13. *Shi J, van de Stadt L.A., Levarht E.W., Huizinga T.W., Hamann D, van Schaardenburg D, et al.* Anti-carbamylated protein (anti-CarP) antibodies precede the onset of rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis., 2014, 73: 780-3.
14. *Van der Weyden M.B., Kelley W.N.* Human Adenosine Deaminase. Distribution and Properties. J. Biol. Chem. 251: 1976, 5448-5456.
15. *Waggett B.E., S.Gannon and B.C. McGorum.* Use of the Ouchterlony double immunodiffusion method to observe antigen/antibody interactions in serum taken from Equine Grass Sickness cases and Co-grazers of Equine Grass Sickness, 2010.
16. *Walther J van Venrooij and Ger J.M Pruijn,* How citrullination invaded rheumatoid arthritis research; Arthritis Research & Therapy, 2014, 16: 103.