

О СВЯЗИ МЕЖДУ УРОВНЯМИ МОЧЕВОЙ КИСЛОТЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ КОМПЛЕМЕНТА

Бельтюков П.П.¹,

Токарев А.Ю.¹,

Смирнова А.С.¹,

Бельтюкова М.Е.²

¹ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, Ленинградская область, Россия

²ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

THE RELATIONSHIP BETWEEN SERUM URIC ACID LEVELS AND COMPLEMENT FUNCTIONAL ACTIVITY

Beltyukov P.P.^a,

Tokarev A.Yu.^a,

Smirnova A.S.^a,

Beltyukova M.E.^b

^aResearch Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology of the Federal Medical-Biological Agency, Leningrad Region, Russian Federation

^bFederal State Budgetary Institution “Almazov National Medical Research Centre” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russian Federation

Резюме

Мочевая кислота является конечным продуктом обмена пуриновых нуклеотидов и веществом, способствующим развитию хронического воспалительного процесса. Одним из механизмов развития воспаления, связанного с действием мочевой кислоты, является способность кристаллов её солей, в основном моновалентной соли, активировать инфламмосомы NLRP3. На этом основании мочевая кислота и кристаллы её солей отнесены к молекулярным паттернам, связанным с повреждением (DAMP). К эффектам кристаллов солей мочевой кислоты, связанных с ответом иммунной системы, относится и их способность активировать систему комплемента. Результатом такой активации становится повышение концентраций C3a, C4a и C5a, а также избыточное расходование белков системы комплемента. Несмотря на то, что о способности мочевой кислоты активировать систему комплемента известно давно, сведения о связи гиперурикемии и функциональной активности комплемента, которую можно оценить по комплемент-опосредованному гемолизу в литературе отсутствуют. Поэтому обоснование предельной концентрации мочевой кислоты в крови, не приводящей к спонтанной активации системы комплемента, является актуальным вопросом. В настоящем исследовании предпринята попытка установить предельные концентрации мочевой кислоты, которые не оказывают эффекта на функциональную активность комплемента, оцененную по параметрам комплемент-опосредованного гемолиза. В ходе исследования оценены взаимосвязи между параметрами функциональной активности комплемента и некоторыми биохимическими показателями крови с концентрацией мочевой кислоты методами корреляционного анализа. В качестве показателей функциональной активности комплемента рассматривали скорость (V_{lys}) и время 50%-ного гемолиза (T_{50}). Взаимосвязи между исследованными показателями удалось продемонстрировать с использованием показательной функции $y=a \cdot e^{[x]}$, которая в данном случае принимает вид $y=[МК] \cdot e^{[C3]}$.

Аргументом функции является концентрация C3, основание степени равно основанию натурального логарифма, а коэффициент пропорциональности равен концентрации мочевой кислоты. Как оказалось, значения данной функции находятся в обратной зависимости от соответствующих значений T_{50} ($r = -0,83$, $p < 0,0001$) в диапазоне концентрации мочевой кислоты, превышающей 370 мкМ. Это значение концентрации мочевой кислоты почти равно верхней границе нормы для женщин и находится в пределах диапазона нормы для мужчин. Таким образом, подход к оценке роли мочевой кислоты в активации комплемента с использованием анализа параметров комплемент-опосредованного гемолиза эффективен для демонстрации патогенетической функции мочевой кислоты в развитии воспалительного процесса без вовлечения инфламмасом путем прямого воздействия на процессы активации комплемента. По нашему мнению, этот эффект реализуется главным образом за счет альтернативного пути комплемента. Продemonстрированные связи позволяют говорить об условности верхних границ диапазона нормальных концентраций мочевой кислоты и вероятной целесообразности их пересмотра.

Ключевые слова: мочевая кислота, гиперурикемия, система комплемента, факторы комплемента, С-реактивный белок, IgM

Abstract. Uric acid (UA) is the end product of purine metabolism and a substance that promotes a chronic inflammatory process. One of the mechanisms of inflammation associated with the UA is the ability of its crystals, mainly monosodium urate, to activate NLRP3 inflammasomes, classifying UA and its salt crystals as damage-related molecular patterns (DAMPs). These crystals also activate the complement system, leading to increase in C3a, C4a, and C5a concentrations and excessive consumption of complement system proteins. It has been known for a long time that UA is able to activate the complement, but the relationship between hyperuricemia and complement system functional activity, which can be assessed by complement-mediated hemolysis, remains unclear. In this study we have made

an attempt to estimate the UA concentration that does not lead to spontaneous complement system activation. The study assessed the relationships between the parameters of complement functional activity and some blood biochemical data with UA concentration ([UA]) using correlation analysis. The rate (V_{lys}) and time of 50% hemolysis (T_{50}) were considered as indicators of complement functional activity, and their relationship was demonstrated using exponential functions $y=a*e^{[x]}$, which takes the form $y=[UA]*e^{[C3]}$. Concentration of C3 is the argument of the function, base of degree is the base of the natural logarithm, and the proportionality coefficient equal to the UA concentration. Correlation analysis showed the inverse dependent between function values and the corresponding values of T_{50} ($r=-0.83$, $p<0.0001$) in the range of UA concentration exceeding 370 $\mu\text{mol/L}$, which is near to the upper limit of the normal level for women and is within the normal range for men. Thus, the approach to assess the effect of UA on complement activation using the analysis of the complement hemolytic activity is effective to demonstrate the pathogenetic function of UA in the development of the inflammatory process without involving inflammasomes through the direct effects on complement activation processes. The relationships demonstrated suggest that the upper limits of the range of “normal” UA concentrations are ambiguity and the probable expediency of their revision.

Key Words: Uric acid, Hyperuricemia, Complement system, Complement factors, C-reactive protein, IgM

Введение. К настоящему времени сложилось представление о том, что мочевая кислота (МК) является одним из молекулярных паттернов, связанных с повреждением (DAMP). Доказано, что кристаллы МК способны прямо активировать инфламмосомы NLRP3 [1]. Известно, что кристаллы солей МК, способны активировать комплемент и способствуют увеличению уровней C4a, C3a и C5a [5]. Активация комплемента уратами *in vitro* может приводить к снижению содержания белков системы комплемента в крови [4]. Интерес к оценке роли МК в развитии воспаления устойчиво растёт в последние десятилетия. Показано наличие связи между содержанием МК в сыворотке крови и уровнями ряда маркеров воспаления (CRP, TNF- α , IL-6, MCP-1, VCAM-1, ICAM-1) [3].

Вместе с тем, до сих пор нет ясного представления о концентрационно-функциональных связях между МК, ключевыми белками комплемента и функциональными параметрами комплемент-опосредованного гемолиза. Считаем, что выявление и описание таких связей даёт возможность обосновать концентрации МК, которые не стимулируют спонтанную активацию комплемента. Для установления взаимосвязей между концентрацией МК в крови и её возможным влиянием на систему комплемента определены отдельные биохимические показатели крови и функциональные параметры комплемент-опосредованного гемолиза эритроцитов кролика при активации альтернативного пути (АПК) и при одновременной активации классического пути и АПК.

Материалы и методы. Исследованы 62 сыворотки крови пациентов терапевтического профиля от 32 мужчин и 30 женщин в возрасте от 21 до 87 лет. Биохимические показатели сыворотки крови определены на анализаторе «Sapphire 400» (Япония) с использованием наборов реактивов Randox (Великобритания). Во всех образцах определены: концентрации общего белка, альбумина, мочевой кислоты, С-реактивного белка (CRP), IgM и концентрации факторов C3 и C4.

30 Параметры функциональной активности комплемента исследовали при
31 кинетической регистрации в планшетах для иммунологических реакций на
32 фотометре Multiscan FC (Thermo Scientific) при 37°C в режиме периодического
33 встряхивания (5 Гц). Измерения экстинкции выполняли при $\lambda=620$ нм каждые
34 20 с.

35 При оценке АПК в составе смеси объёмом 200 мкл присутствовали:
36 20 мкл сыворотки, буферный раствор (50 мкл, pH 7,3) с хелатирующим
37 агентом ЭГТА и $MgCl_2$ (в концентрациях 2 мМ и 4,25 мМ, соответственно), 80
38 мкл физиологического раствора (NaCl, 0,9%) и 50 мкл стандартной суспензии
39 эритроцитов кролика в физиологическом растворе, которая обеспечивала
40 начальное значение экстинкции в диапазоне от 0,85 до 0,95. Суспензию
41 готовили из эритроцитов, стабилизированных в реактиве Олсвера в течение
42 двух месяцев и троекратно отмытых физиологическим раствором
43 непосредственно перед получением рабочей смеси. Эритроциты в планшет
44 вносили последними, после смешивания всех остальных компонентов.

45 Регистрацию гемолиза в условиях одновременной активации
46 классического и альтернативного путей комплемента проводили в таких же
47 условиях, но без ЭГТА, в присутствии $CaCl_2$ и $MgCl_2$ в конечных
48 концентрациях 1,275 мМ и 4,25 мМ, соответственно. Образцом для анализа
49 служила сыворотка, разбавленная физиологическим раствором в 2 раза.
50 Остальные компоненты смеси были такими же, как и при регистрации
51 активации АПК.

52 В ходе регистрации кинетики гемолиза измерены и использованы для
53 анализа два параметра: максимальное значение скорости гемолиза (V_{lys}),
54 равное наибольшему изменению экстинкции (dE_{620}) в интервале между двумя
55 измерениями и время 50%-ного лизиса (T_{50}) равное интервалу от стартового
56 измерения до достижения экстинкции равной 50% от начального значения
57 экстинкции. Анализировали различия в параметрах активации комплемента и
58 их связи с концентрациями МК, CRP, IgM, C3 и C4. Оценены корреляционные

связи между показателями и частота встречаемости образцов с различными уровнями V_{lys} и T_{50} в пределах групп, ранжированных по концентрациям МК.

В качестве граничных значений при разделении образцов по группам на основе измеренных концентраций МК выбраны значения 370 мкМ (6,22 мг/дл) и 270 мкМ (4,54 мг/дл). Основанием для такого выбора служат данные о растворимости МК при изотонических концентрациях NaCl (0,15 М), которые близки выбранному значению 370 мкМ [2]. Концентрации белка в смесях соответствовали 10% от общего белка в сыворотке ($M \pm SD = 6,01 \pm 0,60$ г/л). Такая концентрация белка не может оказывать существенного влияния на растворимость МК. Кроме того, при 10-кратном разбавлении сыворотки крови конечная концентрация МК в смеси не могла способствовать образованию кристаллов уратов *in situ*. Таким образом, различия V_{lys} или T_{50} , связываемые с [МК], должны отражать влияние на систему комплемента кристаллов, или суммы кристаллов и растворённой МК в исследуемых образцах сыворотки крови.

Результаты и их обсуждение. Анализ показателей активности комплемента и биохимических параметров сывороток показал, что среди всех образцов с высокой активностью АПК ($T_{50} < 600$ с) около 45% содержали мочевую кислоту в концентрациях > 370 мкМ и лишь 12,5% образцов с такой же концентрацией мочевой кислоты продемонстрировали пониженную функциональную активность АПК ($T_{50} > 600$ с). При оценке связи между V_{lys} и [МК] в рамках эксперимента в группе с высоким значением V_{lys} ($dE_{620} > 0,042$) доля образцов с [МК] > 370 мкМ составила 31% (14 из 45), а в образцах с низким значением V_{lys} ($dE_{620} < 0,042$) доля таких же образцов равна 17,6% (3 из 17). Таким образом, можно говорить о наличии связи между частотой встречаемости образцов с высокими концентрациями МК и высокой функциональной активностью АПК.

В общей совокупности исследованных образцов не выявлено статистически значимой связи между [CRP] и функциональной активностью

комплемента и не показано взаимного влияния МК и CRP на параметры активации комплемента. Однако при оценке влияния «фоновых» концентраций IgM на эффекты МК и CRP в отношении АПК оказалось, что при «низких» уровнях IgM (<1 г/л, $n=35$) наблюдается умеренная обратная корреляция между T_{50} и [CRP] ($r=-0,5329$; $p<0,0005$).

При анализе полной выборки ($n=62$) не было выявлено статистически значимой корреляции между уровнями [МК], V_{lys} и T_{50} как для АПК, так и для суммарной активации комплемента. Анализ связей между [C3], [C4] и параметрами активации комплемента в образцах с уровнями [МК]=100-370 мкМ (I) и [МК]>370 мкМ (II) показал, что они значительно отличаются. В группе I отсутствует корреляция между [C3] или [C4] в отношении V_{lys} для АПК, но есть негативная корреляция между [C3] и [C4] в отношении T_{50} , ($r=-0,4361$, $p=0,0025$; и $r=-0,4409$, $p=0,0022$, соответственно). Для группы II ($n=17$) показано, что как для [C3], так и [C4] отсутствует корреляция с T_{50} , но есть ожидаемая позитивная корреляция с V_{lys} . Для [C3] коэффициент $r=0,4638$, $p=0,0304$, а для C4 $r=0,5718$, $p=0,0082$. Для этих показателей ожидание высоких уровней значимости и тесноты связей маловероятно, поскольку между конечным результатом анализа гемолитической активности комплемента и абсолютными значениями концентраций C3 и C4 линейная зависимость возможна только при крайнем дефиците этих белков в анализируемых образцах. Кроме того, надо понимать, что корреляция между C4 и T_{50} для АПК отражает в большей степени не вклад C4 в активацию АПК, а наличие связи между [C3] и [C4]. Корреляция между [C3] и [C4] в нашей выборке сывороток была значительной ($r=0,8009$; $p<0,0001$). Кроме того, уровни альбумина в образцах также в значительной степени связаны, как с [C3] ($r=0,4174$; $p=0,0007$), так и с [C4] ($r=0,4586$; $p<0,0002$). Эти связи между C3, C4 и альбумином ожидаемы и обусловлены тем, что синтез этих белков протекает в клетках одного типа, в основном, в гепатоцитах.

В связи с необходимостью учёта нелинейного характера связи между концентрацией СЗ и показателями гемолиза (T_{50} или V_{lys}) для оценки вклада МК в активацию комплемента выполнили корреляционный анализ с использованием значений двух функций, как характеристик СЗ и МК: линейной функции $y=[МК]*[СЗ]$, и показательной функции $y=[МК]*e^{[СЗ]}$.

Из расчёта исключили все образцы с $[МК]<100$ мкМ – такие уровни свидетельствуют о возможном разбавлении крови, например, при инфузионной терапии. При $[МК]=100-600$ мкМ выявлена умеренная обратная корреляция между T_{50} vs $[СЗ]$, $[МК]*[СЗ]$ и $[МК]*e^{[СЗ]}$ ($r=-0,439$, $-0,4299$ и $-0,5146$, соответственно). Для величины $[МК]*e^{[СЗ]}$ уровень значимости составил $p=0,0002$. Любопытно, что корреляция между V_{lys} и $[МК]*[СЗ]$ тоже оказалась существенной ($r=0,4510$, $p=0,0007$). Эти факты сами по себе не являются убедительным доказательством вклада МК в процессы активации АПК, поскольку коэффициенты корреляции невелики.

При оценке связи T_{50} vs $[МК]*e^{[СЗ]}$ в образцах с $[МК]>270$ мкМ ($n=34$) получены значения $r=-0,5453$ и $p<0,0004$. В выборке для $[МК]>370$ мкМ ($n=16$), связь между T_{50} и $[МК]*e^{[СЗ]}$ оказалась более существенной ($r=-0,8262$ при $p<0,0001$). Несмотря на то, что ведущей переменной, влияющей на V_{lys} и T_{50} , является величина $e^{[СЗ]}$, включение в формулу расчета значения $[МК]$ в качестве сомножителя существенно повышает как коэффициент корреляции, так и уровень значимости анализируемой связи. Зависимость между T_{50} и величиной $[МК]*e^{[СЗ]}$ при активации АПК представлена на рисунке 1.

Рисунок 1 – Зависимость T_{50} при активации АПК от величины $[МК]*e^{[СЗ]}$

На основании выявленных закономерностей, можно утверждать, что при $[МК]>370-400$ мкМ, конечный метаболит пуринового обмена может вносить значительный вклад в спонтанную активацию системы комплемента. Следует

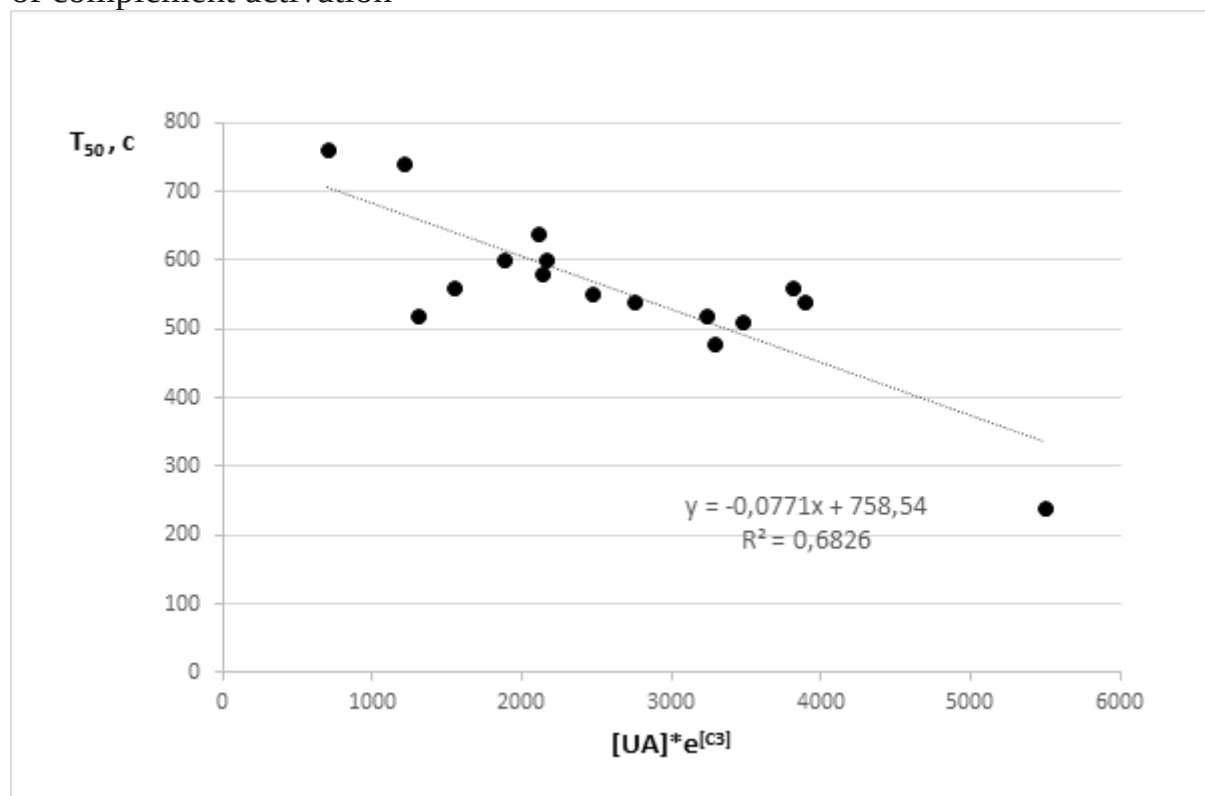
отметить, что в исследованных нами образцах сывороток крови с признаками гиперурикемии при оценке концентраций С3 и С4 турбидиметрическим методом не было выявлено признаков снижения концентрации этих белков.

Таким образом, наряду со способностью мочевой кислоты активировать инфламмасомы, её влияние на процессы активации комплемента является самостоятельным фактором, способствующим поддержанию хронического воспалительного процесса.

РИСУНКИ

Рисунок 1. Зависимость T_{50} при активации АПК от величины $[UA] \cdot e^{[C3]}$

Figure 1. Dependence of T_{50} on the value of $[UA] \cdot e^{[C3]}$ upon alternative pathway of complement activation



ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДАННЫЕ**Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку**

Бельтюков Пётр Петрович, кандидат медицинских наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной токсикологии и экспериментальной терапии ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия, 188663, Ленинградская область, Всеволожский м.р-н, Кузьмолдовское г.п., гп Кузьмолдовский, ул. Заводская, зд. 6/2, корп. 93, Российская Федерация

Телефон/Факс: (812) 449-61-68 (доб.340)

т. +7(921)341-21-22

т./WhatsApp/Telegram +7(911)232-17-18

e-mail: biochem2005@rambler.ru

Beltyukov Petr Petrovich., PhD (Medicine), Associate Professor, Leading Researcher, Laboratory of Molecular Toxicology and Experimental Therapy of the Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology of the Federal Medical-Biological Agency 188663, Leningrad Region, Vsevolozhsky district, g.p. Kuzmolovskii, Zavodskaya street 6/2, build. 93, Russian Federation (812) 449-61-68 (доб.340)

т. +7(921)341-21-22

т./WhatsApp/Telegram +7(911)232-17-18

e-mail: biochem2005@rambler.ru

Блок 2. Информация об авторах

Токарев Алексей Юрьевич¹, научный сотрудник лаборатории молекулярной токсикологии и экспериментальной терапии ФГУП «Научно-
Russian Journal of Immunology (Russia)

ISSN 1028-7221 (Print)

ISSN 2782-7291 (Online)

исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека»
ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Tokarev Aleksey Yurievich^a, Research Associate, Laboratory of Molecular Toxicology and Experimental Therapy Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology of the Federal Medical-Biological Agency, 188663, Leningrad Region, Vsevolozhsky district, g.p. Kuzmolovskii, Zavodskaya st. 6/2, building 93, Russian Federation

Смирнова Александра Сергеевна¹, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной токсикологии и экспериментальной терапии ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Smirnova Aleksandra Sergeevna^a, Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Toxicology and Experimental Therapy Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology of the Federal Medical-Biological Agency, 188663, Leningrad Region, Vsevolozhsky district, g.p. Kuzmolovskii, Zavodskaya st. 6/2, building 93, Russian Federation

Бельтюкова Марина Евгеньевна², врач клинко-диагностической лаборатории лечебно-реабилитационного центра ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Beltyukova Marina Evgenievna^b, Clinical laboratory diagnostics specialist, Almazov National Medical Research Centre, Saint-Petersburg, Russian Federation Federal State Budgetary Institution “Almazov National Medical Research Centre” of the Ministry of Health of the Russian Federation, 197341, Akkuratova street, 2, Saint Petersburg, Russian Federation

¹ ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Affiliation:

^a **Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology of the Federal Medical-Biological Agency, 188663, Leningrad Region, Vsevolozhsky district, g.p. Kuzmolovskii, Zavodskaya st. 6/2, building 93, Russian Federation**

^b **Federal State Budgetary Institution “Almazov National Medical Research Centre” of the Ministry of Health of the Russian Federation, 197341, Akkuratova street, 2, Saint Petersburg, Russian Federation**

Блок 3. Метаданные статьи

О СВЯЗИ МЕЖДУ УРОВНЯМИ МОЧЕВОЙ КИСЛОТЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ КОМПЛЕМЕНТА

THE RELATIONSHIP BETWEEN SERUM URIC ACID LEVELS AND COMPLEMENT FUNCTIONAL ACTIVITY

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

Мочевая кислота и комплемент

Uric acid and complement

Ключевые слова: мочевая кислота, гиперурикемия, система комплемента, факторы комплемента, С-реактивный белок, IgM

Key Words: Uric acid, Hyperuricemia, Complement system, Complement factors, C-reactive protein, IgM

Раздел Объединенный иммунологический форум 2024

Количество страниц текста – 6

Количество таблиц – 0

Количество рисунков – 1

Дата поступления: 31.03.2024

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи или ее doi.
1	Braga TT, Forni MF, Correa-Costa M, Ramos RN, Barbuto JA, Branco P, Castoldi A, Hiyane MI, Davanzo MR, Latz E, Franklin BS, Kowaltowski AJ, Camara NO. Soluble Uric Acid Activates the NLRP3 Inflammasome. Sci Rep. 7:39884, 2017, pp.1-14.	-	www.nature.com/scientificreports doi: 10.1038/srep39884. PMID: 28084303; PMCID: PMC5233987.
2	Kippen I, Klinenberg JR, Weinberger A, Wilcox WR. Factors affecting urate solubility in vitro.// Annals of the Rheumatic Diseases. – 1974. Vol.33(4).- pp.313-317.	-	doi: 10.1136/ard.33.4.313. PMID: 4413418; PMCID: PMC1006264.
3	Lobo J.C., Lucas A.C., da Nóbrega A., Carraro-Eduardo J.C., Mafra D. Uric acid levels correlates with inflammatory markers and adhesion molecules in hemodialysis patients.// Kidney Research and Clinical Practice (2012), 31(2). – P.A53.	-	doi: 10.1016/j.krcp.2012.04.472
4	Russell IJ, Papaioannou C, McDuffie FC, MacIntyre S, Kushner I. Effect of IgG and C-reactive protein on complement depletion by monosodium urate crystals. J Rheumatol. 1983 Jun;10(3):425-33.	-	PMID: 6887165.
5	Wessig AK, Hoffmeister L, Klingberg A, Alberts A, Pich A, Brand K, Witte T, Neumann K. Natural antibodies and CRP drive anaphylatoxin production by urate crystals. Sci Rep. 2022 Vol.12(1): 4483. pp.1-13.	-	www.nature.com/scientificreports doi: 10.1038/s41598-022-08311-z. PMID: 35296708; PMCID: PMC8924570.