

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ АНТИТЕЛ К ЦИКЛИЧЕСКОМУ ЦИТРУЛЛИНИРОВАННОМУ ПЕПТИДУ ПРИ РАННЕМ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ

Лапин С.В., Маслянский А.Л. **, Иливанова Е.П. *,
Мазуров В.И. **, Тотолян А.А.

Научно методический центр МЗ РФ по молекулярной медицине Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П.Павлова;

* Ленинградская областная клиническая больница, Областной ревматологический центр;

** Санкт-Петербургская медицинская академия постдипломного образования, Россия

Резюме. Антитела к циклическому цитруллин-содержащему пептиду (ССР) являются новым маркером ревматоидного артрита (РА). Они могут занимать особое место в связи с их высокой специфичностью при РА, составляющей более 90%.

Нами был оценен серологический статус 63 больных с критерияльно подтвержденным диагнозом РА, из них 9 были обследованы в динамике. Исследуемые группы составили 38 пациентов с ранним РА менее 2 лет от начала заболевания и 25 больных РА с анамнезом от 2,5 лет. В сыворотке больных исследовалась концентрация антител к ССР, АКА, АПФ, РФ, АНФ с помощью метода непрямой иммунофлюоресценции. Субстратом для реакции непрямой иммунофлюоресценции служили серийные криосрезы средней трети пищевода крысы толщиной 4 мкм и клетки буккального эпителия щеки здорового донора. Для обнаружения антител к ССР использовался метод DIASTAT Анти-ССР ELISA (Axis Shield, Великобритания).

Антитела к ССР были обнаружены у 66% больных с ранним РА и 72% пациентов с текущим РА и несколько уступали РФ, который был обнаружен у 68% и 80% соответственно. В группе больных, у которых отсутствовал РФ, выявляемость антител к ССР составила 30% (6/20).

Антитела к ССР встречались у больных с большей активностью заболевания и выраженным суставным синдромом. У больных с антителами к ССР были достоверно выше параметры функциональной недостаточности, оцененные по индексам HAQ и Лн.

Таким образом, антитела к ССР определяют популяцию больных РА, у которых заболевание начинается раньше и протекает более агрессивно. Выявление этих антител у больных с ранним РА может являться основанием для более активной терапии таких больных для предупреждения развития суставных эрозий и системных проявлений.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, аутоантитела, антитела к ССР, антифилаггриновые антитела.

Lapin S.V., Maslyanski A.L., Ilivanova E.P., Mazurov V.I., Totolian A.A.

CLINICAL SIGNIFICANCE OF ANTI-CYCLIC CITRULLINATED PEPTIDE (ССР) ANTIBODIES IN PATIENTS WITH EARLY RHEUMATOID ARTHRITIS

Abstract. Anti-CCP antibodies are new markers of rheumatoid arthritis (RA). They are remarkable because of almost 100% specificity in this condition which significantly exceeded specificity of RF.

Адрес для переписки:

197089, Санкт-Петербург,

ул. Льва Толстого, д. 6/8

Научно Методический центр МЗ РФ

по молекулярной медицине Санкт-Петербургского

Государственного Медицинского Университета

им. акад. И.П.Павлова. Лапину Сергею Владимировичу

Тел.: (812) 238-71-94. E-mail: svlapin@mail.ru

The clinical utility of anti-CCP of RA was tested in 63 patients with RA verified according ARA criteria. Among them were 38 patients less then 2 years from the onset of RA (early RA) and 25 patients with RA lasting more than 2.5 years. Patients were tested for anti-CCP antibodies with DIASTAT Anti-CCP ELISA (Axis Shield, UK). Antikeratin antibodies (AKA) and anti-perinuclear factor (APF) were measured by indirect im-

munofluorescence on serial criosections of rat esophagus and buccal epithelial cells. Rheumatoid factor (RF) was measured with latex agglutination test.

Anti-CCP antibodies were found in 66% patients with early RA and 72% of patients with long-lasting RA. In comparison RF was detected in 68 and 80% cases. Anti-CCP were found in 30% of patients with seronegative RA. Anti-CCP, AKA and APF should be used together because combined frequency exceeds the frequency of detection of RF. Anti-CCP antibodies were predominantly found in patients with high disease activity and with higher number of affected joints and extraarticular manifestations. Also in patients with autoantibodies the indexes of functional disability (Lee, HAQ) were significantly higher than in patients without autoantibodies. In conclusion the presence of anti-CCP antibodies determine the disease subset with more aggressive course of RA. These antibodies can be detected in seronegative RA. Positive result of an autoantibody test can be a reason for more active therapy of an RA patient for the effective prevention of articular erosions and extraarticular manifestations. (*Med.Immunol.*, 2004, vol.6, № 1-2, pp 57-66)

Ревматоидный артрит (РА) представляет собой хроническое аутоиммунное заболевание, характеризующееся хроническим воспалением и разрушением суставов. Хотя диагноз РА ставится преимущественно на основании клинических данных, значительную роль в диагностике этого заболевания играет иммунологическое обследование, позволяющее установить воспалительную активность процесса, а также обнаружить широкий спектр серологических маркеров [2], из которых наиболее известным является ревматоидный фактор (РФ). Выявление аутоантител при РА не только позволяет подтвердить диагноз при неясной клинической картине, но и является одним из методов определения прогноза заболевания [5, 7].

Среди аутоантител, встречающихся при РА, антифилаггриновые аутоантитела являются наиболее специфичными и постепенно становятся признанным лабораторным тестом для его диагностики. Первоначально АФА были описаны с помощью непрямой иммунофлуоресценции, благодаря характерному линейному окрашиванию ороговевающих слоев эпителия пищевода крысы [27], за что получили название антикератиновые антитела (АКА). Другие аутоантитела этого семейства, получившие название антиперинуклеарный фактор (АПФ), при непрямой иммунофлуоресценции связывается с кератогиалиновыми гранулами в цитоплазме клеток эпителия щеки человека [18]. Работами группы исследователей под руководством Serge G. в 1995 году было показано, что АКА и АПФ направлены на схожие антигены, что позволило отнести их к одному семейству аутоантител – антифилаггриновым антителам (АФА) [21]. Антигеном этих антител является белок филаггрин, который участвует в агрегации цитокератиновых филаментов в клетках ороговевающего эпителия, точнее его предшественник профилаггрин [24]. Профилаггрин синтезируется в качестве фосфорилированного полипептида, содержащего до 10 филаггриновых повторов. Белок хранится в гранулах и подвергается деиминированию и ограниченному протеолизу при сборке цитокератинового скелета эпителиоцита. В ороговевающем эпителии человека аутоантитела реагируют с его изоформами

филаггина массой 37 и 40 кДа, в то время как в эпителии крысы основными антигенами являются три профилаггрин-ассоциированных белка с массами 210 кДа, 90-120 и 60-130 кДа [10].

Клиническое значение АКА и АПФ долгое время находилось под вопросом, однако неоднократно демонстрировалась их высокая специфичность при РА, достигающая 90-100%, при встречаемости составляющей 40-80%. Кроме того, отмечалось, что они выявляются еще до начала клинических проявлений заболевания и могут служить для ранней диагностики РА [14].

Сравнительно недавно, было показано, что АФА связываются с антигенными мишенями, содержащими аминокислоту цитруллин, образующуюся при деиминировании аргинина, с помощью фермента пептидил-аргинин деминазы [11]. К мишеням относятся филаггрин, виментин, Sa-антиген, антитела к которому также причисляют к семейству АФА. В качестве основного индуктора АФА рассматривают α - и β -цепи дезиминированного фибрина, которые накапливаются в воспаленном синовиуме. Наличие цитруллинированных белков особенно характерно для воспалительной синовиальной оболочки при РА, где они выступают и в качестве основной мишени АФА [26].

Эти исследования позволили Schellekens G.A. с соавт. [21] описать линейные иммунодоминантные пептиды филаггина, содержащие цитруллин. За счет замены серина на цистеин был создан циклический цитруллинированный пептид (ССР), более точно отражающий конформационную структуру нативного белка, что увеличило сродство АФА к этому антигену. Это привело к разработке иммуноферментных тест систем для выявления антител к ССР, что упростило определение АФА для диагностики РА.

Чувствительность выявления антител к ССР практически не уступает по чувствительности РФ и составляет 50-80%, однако антитела к ССР значительно превосходят РФ по специфичности, которая оценивается как 96-99%. В связи с этим, одной из основных перспектив использования ССР в клинике представляется диагностика раннего РА. Кроме

того, этот тест может быть полезен для определения прогноза заболевания, указывая на больных с агрессивным течением РА. Совместно с РФ, антитела к ССР позволяют поставить диагноз до развития суставных деструкций и максимально рано назначить специфическую базисную терапию, способную предотвратить раннюю инвалидизацию больного [5].

Целью нашей работы явилось определение значимости антител к ССР в клинике и сравнение этого маркера с РФ, а также другими представителями АФА, такими как АПФ и АКА, а также антинуклеарным фактором (АНФ).

Материалы и методы

Нами был оценен серологический статус 63 больных с критериально подтвержденным диагнозом РА, из них 9 были обследованы в динамике. Исследуемые группы составили 38 пациентов с ранним РА менее 2 лет от начала заболевания и 25 больных РА с анамнезом от 2,5 лет. Средний возраст больных составил $50,6 \pm 11,3$ лет, 12% (8/63) были мужчины и 88% (55/63) женщины. Клиническая характеристика больных РА в соответствии с рабочей классификацией заболевания представлена в табл. 1.

Проводилось комплексное обследование больных, включающее общеклинические, инструментальные и лабораторные методы. Были зафиксированы анамнестические и объективные данные относительно длительности и истории заболевания, стадии и выраженности суставной деструкции, клинических параметров активности и внесуставных проявлений заболевания, а также зарегистрированы основные лабораторные показатели и проводимая терапия.

Для объективизации суставного синдрома подсчитывалось количество припухших суставов, осуществлялась комплексная оценка с помощью суставного индекса Ричи (Ritchie). Для уточнения степени инвалидизации пациентов оценивались параметры функциональной недостаточности суставов. Для этого использовались стандартные опросники для расчета функционального индекса Ли (Lee) и функционального индекса Health Assessment Questionnaire (НАQ), оценивающие способность больных выполнять простые движения в ходе самообслуживания [20].

Для выявления аутоантител образцы крови больных забирались по стандартной методике [6] в пробирки типа Вакутейнер и транспортировались в лабораторию в течение одних суток. Сыворотка отделялась центрифугированием (1000g, 10 мин), пробы алиquotировались и хранились при температуре -30°C вплоть до момента исследования.

Для обнаружения РФ использовался метод агглютинации частиц латекса (НИИ вакцин и сывороток, Санкт-Петербург). Метод был откалиброван стандартами сыворотки, содержащими известное количество международных единиц (IU) РФ. Порог чувствительности метода при титре 1:20 составил 25 МЕ. Это позволило считать титр агглютинации частиц латекса выше 1:40 (40-50 IU) положительным результатом теста [25].

Для обнаружения АКА, АПФ и АНФ использовался метод непрямой иммунофлюоресценции в оригинальной модификации [4]. Субстратом для реакции непрямой иммунофлюоресценции для обнаружения АКА служили серийные криосрезы средней трети пищевода крысы толщиной 4 мкм, изготовленные по стандартной методике. Для выявления АПФ

Табл. 1. КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБСЛЕДОВАННЫХ БОЛЬНЫХ РА

Показатели	Ранний РА (<2 лет) (n=38)	РА (>2 лет). (n=27)
Клинико-анатомическая характеристика:		
– суставная форма	45% (17/38)	49 (13/27)
– суставно-висцеральная форма	55% (21/38)	51 (14/27)
Клинико-иммунологический вариант РА:		
– серопозитивный	68% (26/38)	80% (20/27)
– серонегативный	32% (12/38)	20% (7/27)
Степень активности РА:		
I – низкая	13% (5/38)	11% (3/27)
II – средняя	50% (19/38)	52% (14/27)
III – высокая	37% (14/38)	37% (10/27)
Рентгенологическая стадия:		
- I	53% (20/38)	0%
- II	34% (13/38)	26% (7/27)
- III	13% (5/38)	41% (11/27)
- IV	0%	33% (9/27)
Функциональная недостаточность суставов, степень:		
- I	46% (17/38)	18% (5/27)
- II	42% (16/38)	70% (19/27)
- III	12% (4/38)	12% (3/27)

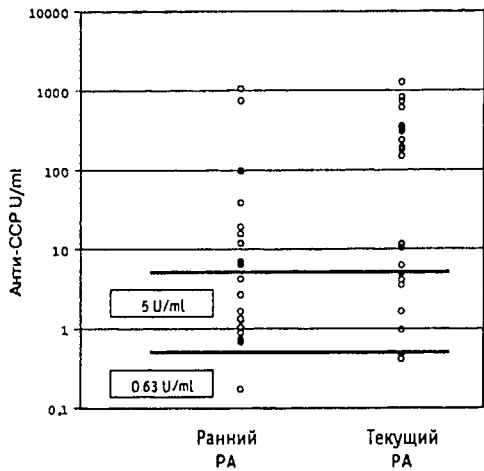


Рис.1. Концентрация антител к ССР у больных РА с ранним и текущим РА. На графике обозначена верхняя граница нормы (5 U/ml) и среднее содержание аутоантител к ССР у здоровых доноров (0,63U/ml)

Табл. 2. ВСТРЕЧАЕМОСТЬ АУТОАНТИТЕЛ ПРИ РА

Аутоантитела	Ранний РА (n=38)		Текущий РА (n=25)	
	Число серопозитивных больных	%	Число серопозитивных больных	%
АКА	18	47	16	64
АПФ	21	55	18	72
Антитела к ССР	25	66	18	72
АФА	27	71	20	80
РФ	26	68	20	80
АФА+РФ	32	84	21	84
АНФ	16	50	12	48

Табл.3. КЛИНИЧЕСКИЕ И ЛАБОРАТОРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ НАЛИЧИЯ АНТИТЕЛ К ССР

Исследуемый показатель	Ранний РА (n=38)		Текущий РА (n=25)	
	Серопозитивные больные (n=24)	Серонегативные больные (n=14)	Серопозитивные больные (n=18)	Серонегативные больные (n=7)
Индекс Ричи, баллы	43,7±25,3	41,9±32,6	41,1±18,9*	23,6±22,7
Число припухших суставов	12±7*	9±3	11±6*	5±3
Скованность, ч	2,8±1,6*	1,6±1,3	2,7±1,5	2,0±1,6
Лихорадка >37°С, n (%)	11 (46)	9 (64)	4 (24)	2 (28)
Системные формы, n (%)	13 (54)	8 (57)	12 (71)	2 (28)
Ревматоидные узлы, n (%)	3 (12)	1 (7)	6 (35)	0 (0)
СОЭ, мм/ч	40±16*	35±15	43±13*	31±20
Коэффициент альбумин/глобулины	1,0±0,2*	1,2±0,3	1,1±0,2*	1,3±0,2
Циркулирующие иммунные комплексы, у.е./мл	151,1±83,8*	108,5±51,5	136,4±64,9	103,9±72,4

Примечание: * р<0,05 при сравнении с серонегативными больными в одной группе

использовались клетки буккального эпителия здорового донора, полученные с помощью соскоба эпителия стерильным шпателем со внутренней поверхности щеки. Субстратом для обнаружения АНФ служили криосрезы печени крысы [3].

Для прикрепления срезов и клеток к предметным стеклам использовали метод силановой адгезии [13], срезы фиксировали высушиванием. Для улучшения детекции антигена перед нанесением разведений сыворотки ткань в течение 10 мин инкубировалась в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) (рН 7,2). Использовались стандартные разведения сыворотки в ФСБ начиная от 1: 10. Лунки вокруг срезов ткани формировались с помощью карандаша-реппелента (DakoPen, Dako, Дания). По 30-50 мкл стандартных разведений сыворотки вносились в лунки с последующей 30-минутной инкубацией во влажной камере. Отмывка в ФСБ длительностью 10 мин позволяла удалить несвязавшиеся сывороточные белки, после чего срезы инкубировались с козьей сывороткой против IgG человека, меченной ФИТЦ (НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва). После 30-минутной инкубации и отмывки срезы монтировались в глицерин, забуференный ФСБ (10:1, рН 8,2), и результат метода визуализировался с помощью флуоресцентного микроскопа (Axioscop-40, Carl Zeiss, Германия).

Линейная флуоресценция *stratum corneum* многослойного плоского эпителия при разведении сыворотки 1:10 рассматривалась в качестве положительного результата выявления АКА. Так же как положительный результат выявления АПФ, учитывалась флуоресценция округлых кератогиалиновых гранул, расположенных вокруг ядра клетки, подкрашенного йодидом пропидия, обнаруживаемая более чем в 10% клеток эпителия щеки. Свечение ядер во всех тканевых субстратах указывало на присутствие АНФ. Титром признавалось конечное разведение сыворотки, обладающее детектируемым уровнем окрашивания тканевого субстрата.

Для выявления антител к ССР использовался метод иммуноферментного анализа (Axis Shield, Великобритания). В соответствии с рекомендациями производителя, сформулированными на основании обследования 200 здоровых доноров, положительным результатом выявления антител к ССР считалась концентрация антител в сыворотке больше 5 U/мл.

Для статистического анализа данных использовался критерий Манн-Уитни, критерий χ^2 и корреляционный анализ по Спирмену. Средние величины приведены как $M \pm \sigma$.

Результаты

Для оценки частоты обнаружения аутоантител в исследуемых группах нами было проведено сероло-

гическое обследование больных. Данные по встречаемости диагностических титров исследуемых аутоантител в группе больных ранним и текущим РА приведены в табл. 2.

Среди группы больных, негативных по антителам к ССР АКА были обнаружены у 14% (3/21), АПФ у 19% (4/21), в то время как антитела к ССР отмечались у 17% (7/42) больных без АПФ и АКА.

При сравнении концентрации антител к ССР у больных с ранним артритом и больных с текущим артритом была выявлена тенденция к повышению уровня антител к ССР у пациентов с длительным течением РА (рис. 1). Кроме того, важно подчеркнуть, что у большинства больных РА, у которых титры антител к ССР были ниже диагностических, содержание антител к ССР в сыворотке крови оказалось выше среднестатистического содержания аутоантител в группе 200 здоровых доноров, обследованных фирмой производителем тест системы. Так, из 21 больного РА с содержанием антител к ССР менее 5 U/мл, у 16 (76%) наблюдалась концентрации аутоантител выше $0,63 \pm 0,42$ U/ml.

Так как использование тестов для обнаружения АКА и АПФ в практической лабораторной работе связано с применением трудоемкого метода непрямой иммунофлуоресценции, мы провели оценку изолированного выявления антител к ССР в качестве альтернативы для иммунофлуоресцентных тестов. При анализе совместной встречаемости представителей семейства АФА в исследованных группах было установлено, что среди больных, негативных по антителам к ССР АКА были обнаружены у 14% (3/21), АПФ у 19% (4/21), в то время как антитела к ССР отмечались у 17% (7/42) больных без АПФ и АКА.

Особый интерес представляет поиск специфических лабораторных маркеров серонегативного клинико-иммунологического варианта РА. Нами проведен анализ частоты встречаемости антител к ССР у серонегативных пациентов РА. В группе больных, у которых отсутствовал РФ, выявляемость антител к ССР составила 30% (6/20). В то же время встречаемость как АКА, так и АПФ в группе серонегативных больных с ранним РА составила по 25% (5/26). Сочетанная встречаемость АФА у больных, серонегативных по РФ, составила 40% (8/20).

При анализе групп больных в зависимости от присутствия антител к ССР, отсутствовала связь между выявлением аутоантител и полом обследуемых пациентов, а также длительностью заболевания. Группа АФА позитивных больных РА достоверно старше (средний возраст составил 53 ± 10 лет) АФА негативных больных (43 ± 11 лет).

Для уточнения клинической значимости аутоантител было проведено сопоставление клинических и лабораторных параметров, характеризующих активность заболевания, и выявление у пациентов раз-

ных групп антител к ССР. Результаты суммированы в табл. 3.

Для оценки прогноза РА в зависимости от серопозитивности по выявляемым антителам была исследована степень функциональной недостаточности суставов. Этот показатель комплексно оценивает различные составляющие физического состояния и позволяет судить о степени утраты пациентом трудоспособности и возможности самообслуживания, таким образом представляя суррогатный маркер исхода РА. Функциональная недостаточность суставов была исследована с помощью интегральных индексов Ли и НАQ. Данные о связи серологического статуса и индексов инвалидизации представлены в табл. 4 и 5. Было обнаружено, что у больных с АФА уже на этапе раннего РА отмечаются достоверно более высокие показатели функциональной недостаточности суставов, что указывает на прогностическое значение данных аутоантител.

Для оценки динамики содержания антител под воздействием проводимой базисной терапией 9 больных РА из обеих групп были обследованы повторно, с интервалом от 2 до 12 месяцев. В качестве критерия улучшения состояния на фоне проводимой терапии оценивалась динамика суставного синдрома, индексов функциональной недостаточности суставов и СОЭ. Это позволило проанализировать влияние иммуносупрессивной терапии на сывороточные уровни аутоантител. Данные представлены в табл. 6. Отмечается, что изменение титров аутоантител не превышает одного разведения сыворотки, что удовлетворяет погрешности метода.

Обсуждение

Для выявления антител к ССР нами была использована тест-система 2-го поколения фирмы Axis Shield. Клинико-лабораторные параметры метода, исследованные производителем [8], приведены в табл. 7.

Таким образом, выявление антител к ССР обладает чувствительностью, сравнимой с чувствительностью РФ, и значительно превосходит РФ по специфичности. Особенно необходимо подчеркнуть тот факт, что антитела к ССР редко выявляются в тех группах больных, которые часто требуют дифференциальной диагностики с РА и обычно сопровождаются выявлением диагностических титров РФ. Это прежде всего системные заболевания соединительной ткани, псориатический артрит и вирусный гепатит С.

Встречаемость аутоантител к ССР у обследованных нами больных ранним РА составила 66 и 72% у больных с текущим РА, таким образом, несколько уступала частоте обнаружения РФ. Однако, принимая во внимание высокий процент выявления АФА у больных с серонегативным клинико-иммунологическим вариантом РА, достигающим 40%, общая встречаемость ССР, АПФ и АКА превысила таковую для РФ и составила 71% всех пациентов с ранним РА. Эти результаты свидетельствуют о важности применения АФА в ранней диагностике РА в качестве необходимого дополнения к традиционно используемому РФ.

Антитела к ССР обладают высокой встречаемостью при РА. Однако у большинства больных РА

Табл.4. ЗНАЧЕНИЯ ИНДЕКСА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ СУСТАВОВ LEE В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВЫЯВЛЕНИЯ АУТОАНТИТЕЛ В ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ БОЛЬНЫХ РА

Аутоантитела	Ранний РА (n=38)		Текущий РА (n=25)	
	Серопозитивные больные (n=24)	Серонегативные больные (n=14)	Серопозитивные больные (n=18)	Серонегативные больные (n=7)
АКА	14,4±5,9***	7,4±6,8	15,4±6,5*	9,1±6,6
АПФ	14,3±5,7**	7,8±6,9	14,5±6,5нд	8,8±6,9
Антитела к ССР	13,4±6,4**	7,1±6,8	14,9±6,9*	8,4±5,2
РФ	13,2±6,6****	4,7±4,6	14,6±6,8*	5,1±5,1

Примечание: нд – недостоверно по сравнению с группой серонегативных; * - p<0,05 по сравнению с группой серонегативных; ** - p<0,01 по сравнению с группой серонегативных; *** - p<0,005 по сравнению с группой серонегативных; **** - p<0,0005 по сравнению с группой серонегативных.

Табл.5. ЗНАЧЕНИЯ ИНДЕКСА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ СУСТАВОВ НАQ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВЫЯВЛЕНИЯ АУТОАНТИТЕЛ В ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ БОЛЬНЫХ РА

Аутоантитела	Ранний РА (n=38)		Текущий РА (n=25)	
	Серопозитивные больные (n=24)	Серонегативные больные (n=14)	Серопозитивные больные (n=18)	Серонегативные больные (n=7)
АКА	1,317±0,829**	0,644±0,556	1,267±0,663 нд	0,906±0,179
АПФ	1,214±0,713нд	7,8±6,9	1,227±0,634нд	0,910±0,597
Антитела к ССР	1,273±0,795***	0,513±0,466	1,316±0,591*	0,645±0,615
РФ	1,187±0,787 **	0,5±0,523	1,313±0,61***	0,525±0,374

Примечание: нд – недостоверно по сравнению с группой серонегативных; * - p<0,05 по сравнению с группой серонегативных; ** - p<0,01 по сравнению с группой серонегативных; *** - p<0,005 по сравнению с группой серонегативных; **** - p<0,0005 по сравнению с группой серонегативных.

без диагностических титров антител к ССР отмечается их специфическое связывание с цитруллинированными, которое значительно превышает средние значения у здоровых лиц (рис.1), что требует применения дополнительных тестов. Сходимость тестов для выявления АКА, АПФ и антител к ССР высока, но приблизительно в 10-20% случаев АКА и АПФ обнаруживаются у больных без антител к ССР, что указывает на разную клиническую значимость всех трех тестов. Это указывает на необходимость комбинированного использования иммунофлуоресцентных тестов для обнаружения АКА и АПФ, что позволяет установить наличие АФА.

Выявляемость аутоантител растет с увеличением длительности заболевания, однако при любом сроке течения РА сохраняется группа пациентов,

серонегативных по всем исследуемым аутоантителам, которая в нашей работе составила 16%. Традиционно указывается, что выявление РФ у больного РА в концентрации более 40 IU/мл в дебюте заболевания является одним из факторов плохого прогноза РА, связанного с более ранним развитием суставных деструкций и инвалидизацией пациента, в то время как у серонегативных больных заболевание протекает более легко [1]. С момента описания АКА и АПФ, их роль в клинике РА подчеркивалась неоднократно [9, 19], однако их прогностическая ценность подвергалась сомнению. Первые проспективные данные, однозначно указывающие на роль АФА в прогнозировании суставных деструкций, были опубликованы только в 1997 [16] и подтверждены более современными исследованиями [15, 17, 23].

Табл.6. ДИНАМИКА КОНЦЕНТРАЦИЙ АУТОАНТИТЕЛ НА ФОНЕ ПРОВОДИМОЙ БАЗИСНОЙ ТЕРАПИИ РА

Больной, возраст	Длительность наблюдения	Схема БТ	Эффект БТ	АКА	АПФ	Антитела к ССР	РФ
1. Б-ва, 50 лет	12 мес	ПХТ, МТХ	↔	↔	↓	(+) н.д.	(+) н.д.
2.К-ва, 62 года	9 мес	МТХ	↑	↓	↔	(+) н.д.	↑
3. Н-ва, 59 лет	9 мес	МТХ	↑	○	○	(+) н.д.	○
4. Ф-ва, 44 года	10 мес	МТХ, ГКС	↔	↓	↓	↓	↑
5. Р-на, 47 лет	3 мес	не получала	↔	↔	↔	↑	↔
6. С-на, 53 года	9 мес	ЦФА	↔	↑	↑	↑	↓
7. П-ва, 50 лет	9 мес	МТХ	↔	↓	↑	↓	↓
8. Б-ко, 62 года	2 мес	МТХ	↔	○	○	↓	↓
9. М-ва, 43 года	8 мес	МТХ	↑	○	○	↓	↓

Примечание: (+) – аутоантитела обнаружены ○ - аутоантитела не обнаружены; ↓ - снижение концентрации аутоантител; ↑ - повышение концентрации аутоантител или клиническое улучшение; ↔ уровень аутоантител не изменялся; н.д. – нет данных. МТХ – метотрексат, ЦФ – циклофосфан, ПХТ – полихимиотерапия, ГКС – глюкокортикостероиды.

Табл.7. ПАРАМЕТРЫ ТЕСТ-СИСТЕМЫ DIASTAT ANTI-ССР ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛА К ССР ПРИ РА И ДРУГИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ (ПО ДАННЫМ AXIS SHIELD, UK)

Заболевание	п больных	Антитела к ССР «+»	Антитела к ССР «-»
РА	575	454 (79%)	121 (21%)
СКВ	227	18 (8%)	209 (92%)
СШ	86	1 (1%)	85 (99%)
Другие СЗСТ и васкулиты	229	4 (2%)	255 (98%)
ОА	66	7 (11%)	59 (89%)
ПсА	49	1 (2%)	48 (98%)
РеА	40	2 (5%)	38 (95%)
ЮРА	9	1 (10%)	8 (90%)
АС	30	0 (0%)	30 (100%)
Другие аутоиммунные и ревматические заболевания	357	15 (4%)	342 (96%)
Всего обследовано больных без РА	1093	50	1044
Специфичность	95,4%		
Чувствительность	79 %		

Примечание: РА- ревматоидный артрит, СКВ – системная красная волчанка, СШ- синдром Шюгрена, ОА- остеоартроз, ПсА – псориатический артрит, РеА – реактивный артрит, ЮРА – ювенильный ревматоидный артрит, АС – анкилозирующий спондилит.

Как нами было показано ранее [4], у больных с АКА и АПФ заболевание протекает с большей активностью. Группа больных РА с АКА характеризовалась достоверно более высокими значениями всех исследованных показателей, отражающими тяжесть суставного синдрома. Надо отметить, что АКА даже превосходят РФ по выраженности клинико-лабораторных корреляций, и, таким образом, представляют важный параметр активности заболевания. Присутствие в сыворотке больных РА диагностических титров аутоантител сопровождалось достоверно более высокими значениями функциональных индексов Ли и НАQ. Титры аутоантител прямо коррелировали с тяжестью инвалидизации больных РА, кроме того у больных с АКА наблюдалась высокая частота резистентных к лечению форм заболевания.

Так как антитела к ССР тесно связаны с АКА и АПФ, нам удалось показать в целом более высокую клинико-лабораторную активность заболевания у больных, обладающих антителами к ССР. У больных с антителами к ССР отмечались более высокие параметры суставного синдрома, причем разница между серонегативными и серопозитивными была более выражена у больных с текущим РА. Ревматоидные узлы выявлялись у больных с ССР несколько чаще, чем у больных без антител, достоверно выше были лабораторные показатели активности заболевания, такие как СОЭ, альбумин-глобулиновый коэффициент и содержание ЦИК (табл. 3).

При анализе функциональных индексов Ли и НАQ в зависимости от выявления аутоантител в исследуемых группах больных РА было показано, что антитела к ССР отмечают у больных РА с худшими показателями функциональной недостаточности суставов. Причем в группе с ранним РА уже наблюдаются признаки инвалидизации больных, серопозитивных по антителам к ССР.

Нам не удалось показать выявить связь эффекта от проводимой базисной терапии и изменениями уровней исследуемых антител в сыворотке (табл. 6). У обследованных в динамике пациентов титры антител отличались незначительно (в пределах одного разведения) и не были связаны с эффектом терапии или клиническим улучшением. Это подчеркивает вторичную роль аутоантител в патогенезе заболевания и позволяет ориентироваться на аутоантитела в качестве надежных параметров прогнозирования артрита.

Полученные нами данные согласуются с уже опубликованными работами, посвященными прогностической ценности антител к ССР при РА В работе Lee D.M. с соавторами [15], частота выявления ССР при РА составляет 60%, антитела встречаются у 34% больных с серонегативным РА, частота суставных деструкций у ССР-положительных пациен-

тов составляет 81% по сравнению с 53% деструкций в группе больных без антител к ССР.

В исследовании Vencovsky J. с соавторами [24], серологически обследовавших 104 пациента с ранним РА (<2 лет), было показано, что серопозитивность по антителам к ССР и IgM РФ позволяет предсказать прогресс суставных деструкций в течение ближайших двух лет. В этой работе антитела к ССР были обнаружены у 42% всех пациентов с ранним артритом, у 81% из них развился эрозивный РА. Суставная деструкция была выявлена у 81% больных с антителами к ССР и у 53% пациентов без этих антител. В нашем исследовании встречаемость антител к ССР при раннем РА несколько выше, так как в исследование включались больные РА с диагнозом, подтвержденным критериями Американского Колледжа Ревматологии, уже на этапе первичного обследования.

В исследовании, выполненном Mayer O. с соавторами [17], был обследован 191 больной текущим РА (средняя длительность заболевания 3,6 лет), частота суставных деструкций оценивалась через 5 лет проспективного наблюдения. Частота выявления антител к ССР, АПФ и АКА составила 57, 46 и 45% соответственно. Значимые деструкции суставов были обнаружены у 66% больных с антителами к ССР и у 42% больных без антител к ССР. В группе больных с антителами к ССР выраженность эрозивного процесса в среднем в 2 раза превышала выраженность деструкций у больных без антител к ССР.

Исходя из литературных данных можно подсчитать, что антитела к ССР позволяют предсказать развитие деструкций приблизительно у 70% пациентов с деструктивным процессом и в сочетании с РФ [25] представляют важный инструмент для раннего распознавания больных РА с плохим прогнозом заболевания уже на этапе установления диагноза. С другой стороны, только раннее начало базисной терапии, получившее название «перевернутой терапевтической пирамиды», при которой более активные препараты назначаются раньше, является основным залогом сохранения функции суставов [1, 5, 12]. Таким образом, благодаря высокой специфичности, антитела к ССР не только рано поставить диагноз РА, но и позволяют определить контингент пациентов с худшим прогнозом, для которых активная терапия будет наиболее адекватна.

Благодарности

Авторы статьи благодарят фирмы ООО «Карл Цейсс» (Москва) и ООО «ВидеоТест» (Санкт-Петербург) за предоставление оборудования и технической поддержки, которая сделала возможным проведение этого исследования.

Список литературы

1. Иванова М.М., Коротеева Д.Е., Акимов Т.Ф. и др. Клинические варианты течения ревматоидного артрита и выбор метода медикаментозной терапии // Клиническая ревматология. – 1994. – № 4. – С. 25-29.
2. Клиническая иммунология и аллергология: Учебное пособие / Под ред. А.В. Караулова. М.: Медицинское информационное агентство, 2002. – 651 с.
3. Лапин С.В. Тотолян А.А. Антиядерные антитела: Лабораторные тесты и диагностическое значение // Медицинская иммунология. – 2001. – Т.3, №1. С. 35-50.
4. Маслянский А.Л., Лапин С.В., Мазуров В.И., Тотолян А.А. Анткератиновые антитела и антиперинуклеарный фактор являются маркерами агрессивного течения ревматоидного артрита // Медицинская иммунология. – 2003. – Т. 5. – № 5-6. С. 599-608.
5. Насонова В.А., Насонов Е.Л. Рациональная фармакотерапия ревматических заболеваний: Руководство для практических врачей. М.: Литература, 2003. – 507 с.
6. Обеспечение качества лабораторных исследований. Справочное пособие. / Под ред. Меншикова В.В. М.: Лабинформ, 1999. – 458 с.
7. Вест С.Д. Секреты ревматологии / Пер. с англ. – М. – СПб.: Издательство БИНОМ - Невский диалект, 1999. 768 с.
8. DIASAT Anti-CCP ELISA. Instruction for use. / Axis Shield, UK, 2003.
9. von Essen R., Kurki P., Isomaki H., Okubo S., Kautiainen H., Aho K. Prospect for an additional laboratory criterion for rheumatoid arthritis // Scand. J. Rheumatol. – 1993. – Vol. 22. – P. 267-72.
10. Girbal E., Sebbag M., Gomes-Daudrix V., Simon M., Vincent C., Serre G. Characterisation of the rat oesophagus epithelium antigens defined by the so-called "antikeratin antibodies", specific for rheumatoid arthritis // Ann Rheum Dis. – 1993. – Vol. 52. – P. 749-757.
11. Girbal-Neuhausser E., Durieux J.J., Arnaud M., Dalbon P., Sebbag M., Vincent C., Simon M., Senshu T., Masson-Bessiere C., Jolivet-Reynaud C., Jolivet M., Serre G. The epitopes targeted by the rheumatoid arthritis-associated antifilaggrin autoantibodies are post-translationally generated on various sites of (pro)filaggrin by deimination of arginine residues // J Immunol. – 1999. – Vol. 162. – P. 585-594.
12. van der Heide A., Jacobs J.W.G., Bijlsma J.W.J., Heurkens A.H.M., van Booma-Frankfort C., van der Veen M.J., et al. The effectiveness of early treatment with "second-line" antirheumatic drugs: a randomized, controlled trial // Ann. Intern. Med. – 1996. – Vol. 124. – P. 699-707.
13. Henderson C. Aminoalkylsilane: An inexpensive simple preparation for slide adhesion // Jour Histo-pathol – 1989. – Vol.12. – P.123-124.
14. Kurki P., Aho K., Palosuo T., Heliövaara M. Immunopathology of rheumatoid arthritis. Antikeratin antibodies precede the clinical disease. // Arthritis Rheum. – 1992. – Vol. 35. – P. 914-917.
15. Lee D. M., Schur P. H. Clinical utility of the anti-CCP assay in patients with rheumatic diseases // Ann. Rheum. Dis. – 2003. – Vol. 62. – P. 870-874.
16. Meyer O., Combe B., Elias A., Benali K., Clot J., Sany J., Eliaou J. F. Autoantibodies predicting the outcome of rheumatoid arthritis: evaluation in two subsets of patients according to severity of radiographic damage // Ann. of the Rheum. Dis. – 1997. – Vol. 56 – P. 682-685.
17. Meyer O., Labarre C., Dougados M., Goupille Ph., Cantagrel A., Dubois A., Nicaise-Roland P., Sibilia J., Combe B. Anticitrullinated protein/peptide antibody assays in early rheumatoid arthritis for predicting five year radiographic damage // Ann. Rheum. Dis. – 2003. Vol. 62 – P.120-126.
18. Nienhuis R.L.F., Mandema E. A new serum factor in patients with rheumatoid arthritis, the antiperinuclear factor // Ann Rheum Dis. – 1964. Vol. 23. – P.302-305.
19. Paimela L., Gripenberg M., Kurki P., Leirisalo-Repo M. Antikeratin antibodies: diagnostic and prognostic markers for early rheumatoid arthritis // Ann. Rheum. Dis. – 1992. – Vol. 51. – P. 743-746.
20. Pincus T. Toward a multidimensional Health Assessment Questionnaire (MDHAQ): assessment of advanced activities of daily living and psychological status in the patient-friendly health assessment questionnaire format // Arthritis Rheum. 1999. – Vol.42. – P.2220-2230.
21. Schellekens G. A., de Jong B. A. W., van den Hoogen F. H. J., van de Putte L. B. A., van Venrooij W. J. Citrulline is an Essential Constituent of Antigenic Determinants Recognized by Rheumatoid Arthritis-specific Autoantibodies // J. Clin. Invest. 1998. – Vol. 101 – P. 273-281.
22. Sebbag M., Simon M., Vincent C., Masson-Bessiere C., Girbal E., Durieux J.J., Serre G. The antiperinuclear factor and the so-called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies // J Clin Invest. – 1995. – Vol. 95. – P. 2672-1679.
23. Simon M., Girbal E., Sebbag M., Gomes-Daudrix V., Vincent C., Salama G., Serre G. The cytokeratin filament-aggregating protein filaggrin is the target of the so-called «antikeratin antibodies» autoantibodies specific for rheumatoid arthritis // J Clin Invest. 1993. – Vol. 92. – P. 1387-1393.
24. Vencovsky J., Machacek S., Sedova L., Kafkova J., Gatterova J., Peshakova V., Ruzickova S. Autoantibodies can be prognostic markers of an erosive disease in early rheumatoid arthritis // Ann. Rheum. Dis. – 2003. – Vol. 62. – P. 427-430.
25. Vittecoq O., Pouplin S., Krzanowska K., Jouen-Beades F., Menard J.F., Gayet A., Daragon A., Tron F., Le

Loet X. Rheumatoid factor is the strongest predictor of radiological progression of rheumatoid arthritis in a three-year prospective study in community-recruited patients / *Rheumatology* – 2003. – Vol.42 – P. 939-946.

26. Vossenaar E. R., Nijenhuis S., Helsen M. M. A., van der Heijden A., Sensus T., van den Berg W. B., van

Venrooij W. J., Joosten L.A.B. Citrullination of Synovial Proteins in Murine Models of Rheumatoid Arthritis // *Arthritis Rheum.* 2003. – Vol.48. – P.2489-2500.

27. Young B.J.J., Mallya R.K., Leslie R.D.G., Clark C.J.M., Hamblin T.J. Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis // *Br Med J.* – 1979. – Vol. 2. – P.97-99.

поступила в редакцию 27.02.2004

принята к печати 18.03.2004