

ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ АНТИТЕЛ К НУКЛЕОСОМАМ У БОЛЬНЫХ «РАННЕЙ» СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ

М.А. Котовская, С.К. Соловьев, Н.Ю. Никишина, Е.Л. Насонов
ГУ Институт ревматологии РАМН, Москва

Резюме

Цель. Изучить клиническое и диагностическое значение антител к нуклеосомам у больных «ранней» системной красной волчанкой (СКВ).

Материал и методы. Обследованы 37 больных «ранней» СКВ (длительность заболевания < 12 мес.). Группа сравнения: 36 больных ревматоидным артритом (РА), 31 больной первичным синдромом Шегрена (СШ); контрольная группа – 45 здоровых доноров. Концентрацию антител к нуклеосомам и двухспиральной ДНК (дсДНК) определяли иммуноферментным методом (ИФМ).

Результаты. Уровень антител к нуклеосомам у больных СКВ ($64,5 \pm 53,7$ ЕД/мл) был достоверно выше, чем у пациентов с РА, СШ ($10,9 \pm 23,7$ ЕД/мл; $p < 0,05$ и $15,7 \pm 11,5$ ЕД/мл; $p < 0,05$ соответственно) и у доноров ($8,3 \pm 5,2$ ЕД/мл; $p < 0,05$). Отмечена выраженная связь между повышенными уровнями антител к нуклеосомам и антител к двуспиральной дезоксирибонуклеиновой кислоте (дсДНК) ($\chi^2 = 14,4$; $p < 0,05$). Чувствительность (87,5%) и специфичность (95%) антител к нуклеосомам в диагностике СКВ не превышали данные показатели антител к дсДНК (85,2% и 93% соответственно). Одновременное обнаружение антител к нуклеосомам и антител к дсДНК повышало специфичность до 97%. Выявлена связь между уровнем антител к нуклеосомам и активностью СКВ ($p < 0,0001$).

Заключение. Определение антител к нуклеосомам с помощью ИФМ является чувствительным и специфичным серологическим тестом для ранней диагностики СКВ, а также отражает активность СКВ.

Ключевые слова: антитела к нуклеосомам, антитела к двухспиральной ДНК, системная красная волчанка

Системная красная волчанка (СКВ) – системное аутоиммунное заболевание неизвестной этиологии, патогенетически связанное с такими нарушениями иммунорегуляции, которые являются причиной гиперпродукции широкого спектра органонеспецифических аутоантител к различным компонентам ядра и иммунных комплексов, вызывающих иммунновоспалительное повреждение тканей и нарушения функций внутренних органов [1].

Основным звеном лабораторной диагностики СКВ является обнаружение аутоантител к клеточным антигенам, преимущественно к ядерным, в частности к гистонам (**anti-HST**) и **двухспиральной ДНК** (дсДНК). Последние в настоящее время остаются наиболее распространенным диагностическим маркерам СКВ, однако они выявляются не более чем у 50 % больных, а их уровень не всегда коррелирует с активностью СКВ [2,3]. Другой, широко известный маркер СКВ – антинуклеарные

антитела (АНФ), имеют относительно низкую специфичность в связи с достаточно высокой частотой обнаружения не только при СКВ, но и при других аутоиммунных заболеваниях.

В последние годы особое внимание уделяется антителам к нуклеосомам [4, 5, 21]. Нуклеосома состоит из двойной спирали ДНК, обмотанной вокруг специфического комплекса из восьми нуклеосомных гистонов (гистонового октамера). Нуклеосома представляет собой дисковидную частицу с диаметром около 11 нм, содержащую по две копии каждого из нуклеосомных гистонов (H2A, H2B, H3, H4). Гистоновый октамер образует белковую сердцевину, вокруг которой дважды обмотана двуспиральная ДНК (146 нуклеотидных пар ДНК на гистоновый октамер). По данным Z. Amoura с соавт. [5], нуклеосомы являются превалирующими патогенетическими антигенами у больных СКВ, а появление антител к нуклеосомам ассоциируется с поражением почек [4-6]. На биологических моделях СКВ было показано, что антитела к нуклеосомам свидетельствуют о развитии клинических проявлений болезни [14]. Однако до настоящего времени

остается дискуссионным вопрос о специфичности антител к нуклеосомам при СКВ, особенно на ранних сроках развития заболевания, нет убедительных данных о преимуществах этого теста перед выявлением дсДНК [14, 15].

Целью настоящего исследования являлось изучение специфичности и чувствительности антител к нуклеосомам при ранней СКВ, их связи с клиническими проявлениями, характером течения, активностью СКВ.

Материал и методы

В исследование было включено 37 больных европеоидной расы с достоверным диагнозом СКВ (не менее 4х критериев Американской коллегии ревматологов, 1997) с давностью заболевания до 12 мес. Все отобранные больные проходили стационарное обследование в клинике ГУ Института ревматологии РАМН и на момент обследования не получали глюкокортикоидные (ГК) препараты и цитостатики. В группу сравнения вошли 36 пациентов ревматоидным артритом (РА) и 31 пациент с первичным синдромом Шегрена (СШ). Группу контроля составили 45 здоровых доноров, сопоставимых с больными СКВ по полу и возрасту.

подавляющую часть больных «ранней» СКВ составляли женщины в возрасте до 30 лет (70%), более позднее начало болезни наблюдалось всего у 4х больных (10,8%). В 13 случаях СКВ развилась у подростков 14-19 лет (35,1%). У 10 из 37 больных обследование проводилось от нескольких недель до 3х мес. от начала СКВ.

Характер течения и активность [16, 17, 18] СКВ, а также частота основных клинических и лабораторных проявлений заболевания представлена в табл. 1, из которой следует, что большинство больных имели острый или подострый вариант течения СКВ, первично хроническое течение было только у 2 пациентов (5,4%). В обследованной группе с наибольшей частотой встречались такие клинические проявления СКВ, как поражение суставов (75,6%), поражение кожи (62%), нефрит (32,4%), поражение ЦНС (5,4%). Среди лабораторных нарушений чаще всего выявлялась лейкопения (у 30% больных) и анемия (в 21,6% случаев), антитела дсДНК и положительный АНФ в диагностических титрах обнаруживались у 86% и 84% больных соответственно.

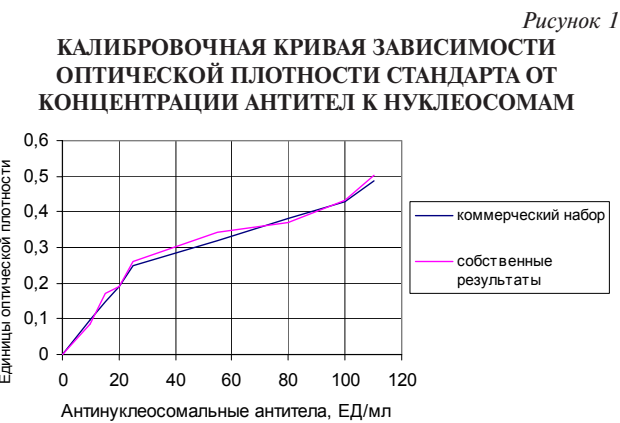
Антитела к нуклеосомам IgG определяли иммуноферментным методом (ИФМ) с использованием коммерческих наборов (Quanta lite, США), согласно инструкции фирмы производителя. В лунки полистироловых планшет вносили по 100 мкл разведенного образца сыворотки (1:500) и инкубировали при 37° С в течение 1 часа. Затем промывали лунки 3 раза фосфатно-солевым буфером, вносили по 100 мкл человеческого IgG в разведении 1:20000 и инкубировали при 37° С в течение 30 мин.

Таблица 1
КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ СКВ.

ПРИЗНАК	ПАЦИЕНТЫ	
	N	%
ТЕЧЕНИЕ		
Острое	27	73,0
Подострое	8	21,6
Хроническое	2	5,4
АКТИВНОСТЬ		
I степень	2	5,4
II степень	26	70,3
III степень	9	24,3
SLEDAI, баллы	12,4 (SD 7,2)	
КЛИНИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ		
ЭРИТЕМАТОЗНЫЕ ПОРАЖЕНИЯ КОЖИ	23	62,2
ПОРАЖЕНИЕ СЛИЗИТЫХ ОБОЛОЧЕК (язвенный стоматит, энантема, хейлит)	5	13,5
ПОРАЖЕНИЕ ЦНС	2	5,4
ПОЛИАРТРИТ/ПОЛИАРТРАЛГИИ	28	75,7
ПОЛИСЕРОЗИТ	11	30,0
НЕФРИТ	12	32,4
— из них с нефротическим синдромом	3	8,1
ПОРАЖЕНИЕ СОСУДОВ		
— livedo reticularis	8	21,6
— синдром Рейно	15	40,5
— капилляриты	5	13,5
ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ		
Анемия (гемоглобин < 100 г/л)	8	21,6
Лейкопения < 3,2 x 10 ⁹ /л	11	30,0
Тромбоцитопения <100 x 10 ⁹ /л	1	2,7
АКЛ (МЕ/мл)	В пределах нормы	
Антитела к дсДНК (>20 ЕД/мл)	32	86,4
Антинуклеарный фактор	31	83,7

Далее промывали лунки 3 раза фосфатно-солевым буфером и вносили 75 мкл субстратного раствора (3,3', 5,5'-тетраметилбензидин, перекись водорода 0,01% и цитратно-фосфатный буфер в разведении 9мл:1мл:4мкл). Планшеты выдерживали 15 мин при 37° С, затем останавливали реакцию 48% раствором серной кислоты и определяли оптическую плотность на спектрометре при длине волны 450 нм. Каждое исследование проводилось в дублях. Верхняя граница нормальной концентрации (Cut off) в соответствии с рекомендациями фирмы производителя, полученными при исследовании 300 сывороток здоровых доноров, составляла 25 ЕД/мл (Mean + 3SD). Калибровочная кривая концент-

рации антител к нуклеосомам сверена с данными, которые были получены нами при исследовании 45 сывороток здоровых доноров. Калибровочная кривая зависимости оптической плотности стандарта от концентрации антител к нуклеосомам представлена на рис. 1.



Антитела к двухспиральной ДНК определяли ИФМ с использованием коммерческих наборов (Quanta lite, США), согласно инструкции фирмы производителя. Верхняя граница нормальной концентрации составляла 20 ЕД/мл (Mean + 3SD), что соответствует результатам, полученным при исследовании 150 сывороток здоровых доноров.

Исследуемые сыворотки хранили при температуре -70 °С. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 7.0, включая методы параметрического и непараметрического анализа (коэффициент корреляции Спирмена, χ^2 -критерий, тест Манна – Уитни, метод Крускала – Уоллеса). Достоверными считали различия при $p < 0,05$. Чувствительность и специфичность выявленных аутоантител в диагностике СКВ рассчитывали согласно рекомендациям Е.С. Vamvakas [20].

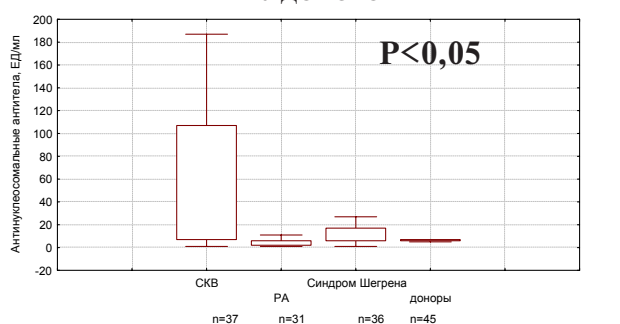
Результаты

В сыворотках доноров уровень антител к нуклеосомам варьировал от 0,26 ЕД/мл до 22,5 ЕД/мл, составляя в среднем $8,3 \pm 5,2$ ЕД/мл. В сыворотках больных РА уровень антител к нуклеосомам определялся в диапазоне от 0,14 до 14,5 ЕД/мл, составляя в среднем $10,9 \pm 23,7$ ЕД/мл, а в группе СШ — от 0,16 до 52,5 ЕД/мл, средний уровень составлял $15,7 \pm 11,5$ ЕД/мл.

Уровень антител к нуклеосомам у больных СКВ варьировал от 0 до 186,6 ЕД/мл, а их средний показатель был $64,5 \pm 53,7$ ЕД/мл. Увеличение уровня антител к нуклеосомам > 25 ЕД/мл отмечено у 33 пациентов СКВ (89,1%), 1 пациента с РА (2,7%), у 5 пациентов с первичным СШ (13,5%) и ни у одного чел. в группе доноров. Концентрация антител к нуклеосомам достоверно превышала показатели контрольной группы, групп больных РА и первичным СШ ($p < 0,05$) (рис. 2).

Рисунок 2

**УРОВЕНЬ АНТИТЕЛ К НУКЛЕОСОМАМ У БОЛЬНЫХ
СКВ, РА, ПЕРВИЧНЫМ СИНДРОМОМ ШЕГРЕНА
И У ДОНОРОВ**



Концентрация антител к дсДНК была повышена у 32 (86,5%) из 37 больных СКВ. В целом отмечена достоверная корреляция между обнаружением антител к нуклеосомам и к дсДНК ($\chi^2 = 14,4$; $p < 0,05$). Результаты сравнительного изучения диагностической чувствительности и специфичности антител к нуклеосомам и дсДНК в диагностике СКВ представлены в табл. 2. Чувствительность и специфичность антител к нуклеосомам были выше, чем у антител к дсДНК, а одновременное выявление данных аутоантител повышало специфичность лабораторной диагностики СКВ до 97%.

Таблица 2

**ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ АНТИТЕЛ
К НУКЛЕОСОМАМ И дсДНК ПРИ СКВ, %**

Показатель	Чувствительность, %	Специфичность, %
Антитела к нуклеосомам IgG	87,5	95
Антитела дсДНК IgG	85,2	93
Антитела к нуклеосомам IgG и антитела дсДНК IgG	79	97

При сравнительной характеристике пациентов СКВ с повышенным уровнем антител к нуклеосомам (> 25 ЕД/мл) и больных с антителами к дсДНК (> 20 ЕД/мл) статистически значимых различий между группами выявлено не было. В обеих группах имелись поражения почек, центральной нервной системы и серозных оболочек. В группе больных с антителами к нуклеосомам чаще выявлялось поражение суставов. Прослежена достоверная связь обоих типов антител с активностью СКВ: у больных как с повышенным уровнем антител к нуклеосомам, так и с повышенным уровнем дсДНК чаще регистрировалась 3 степень активности заболевания, чем 1 и 2 степени. Такое соотношение сохранялось и при балльной оценке активности заболевания с использованием индекса оценки активности SLEDAI ($r = 0,41$; $p < 0,0001$ и $r = 0,32$; $p < 0,05$ соответственно).

Таблица 3

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ АНТИТЕЛ К НУКЛЕОСОМАМ И АНТИТЕЛ К дсДНК

Автор	Группа СКВ, n	Контрольная группа, n	Антитела к нуклеосомам		Антитела к дсДНК	
			Чувствительность, %	Специфичность, %	Чувствительность, %	Специфичность, %
Julkunen H. и соавт. 2005 [9]	296	77 – РА, 32 – СШ, 8 – СЗСТ, 4 – ССД, 1- ПМ	30	92	69	66
Cairns A. и соавт. 2003 [7]	95	48 – РА, 28 – ФМ	64,2	98,8	51,6	98,2
Ghirardello A. и соавт. 2004 [8]	101	48 – инфекционные заболевания, 35 – ССД, 30 – СШ, 20 – РА	86,1	-	95,3	96
Suer W. и соавт. 2004 [12]	295	119 – ССД, 101 – СШ и ПМ	62	100	-	-
Simon J. и соавт. 2003 [11]	73 (СКВ < 1 года)	50 – СЗСТ, 31 АФС, 70 – васкулит, 50 – СШ, 40 – ВМ, 20 – ССД	100	63	97	95
Su Y. и соавт. 2007 [21]	233	41 – СШ, 16 – ДМ, 24 – ПМ, 26 – СЗСТ, 33 – ССД, 35 – РА, 20 – СА, 25 – ДОА	61,8	97,6	46,4	98,4
Собственные результаты	37 (СКВ<1 года)	36 – РА, 31 – СШ	87,5	95	85,2	93

Примечание: РА – ревматоидный артрит, СА – спондилоартропатии, СКВ – системная красная волчанка, СШ – синдром Шегрена, СЗСТ – смешанное заболевание соединительной ткани, ССД – системная склеродермия, ПМ – полимиозит, ФМ – фибромиалгия, АФС – антифосфолипидный синдром, ВМ – воспалительная миопатия, ДОА – деформирующий остеоартроз.

Обсуждение

Полученные результаты подтверждают данные других авторов о высокой диагностической значимости ИМФ определения антител к нуклеосомам в сыворотках крови больных СКВ (табл. 3). Концентрация антител к нуклеосомам у больных СКВ достоверно более высокая, чем у больных РА, СШ и здоровых лиц (доноров). Имеются данные о высокой чувствительности (30 – 100%) и специфичности (92 – 99%) определения этих антител в диагностике СКВ [1, 7-9, 11,12]. Согласно нашим данным, чувствительность антител к нуклеосомам при СКВ составляет 87,5%, специфичность 95%. Различия результатов по оценке чувствительности и специфичности антител к нуклеосомам могут зависеть от подбора больных СКВ и группы сравнения, а также от методических особенностей при проведении реакции [19]. Выявленная нами высокая чувствительность и специфичность антител к нуклеосомам может быть обусловлена высокой аналитической чувствительностью коммерческого набора и гомогенностью исследуемой группы пациентов с СКВ. По данным одних авторов, антитела к нуклеосомам превосходят по диагностической значимости

антитела к дсДНК [13], в то время как по другим сообщениям, антитела к дсДНК обладают более высокой чувствительностью и специфичностью при СКВ [10]. По нашим данным, одновременное определение антител к нуклеосомам и дсДНК позволяет повысить специфичность лабораторной диагностики СКВ до 97%.

Высокая частота обнаружения антител к нуклеосомам у пациентов с «ранней» СКВ, характеризующейся небольшой продолжительностью болезни, свидетельствует о возможности использования ИМФ определения антител к нуклеосомам в диагностике СКВ на ранних сроках заболевания.

Таким образом, определение антител к нуклеосомам с помощью ИМФ является чувствительным и высокоспецифичным серологическим тестом для ранней диагностики СКВ и дифференциальной диагностики СКВ с другими ревматическими заболеваниями.

Определение антител к нуклеосомам и антител к дсДНК выполнялось в рамках совместной научной работы ГУ Института ревматологии (Москва) и Института молекулярной и клеточной биологии (Франция).

ЛИТЕРАТУРА

1. Насонова В.А., Насонов Е.Л. Рациональная фармакотерапия ревматических заболеваний. Рук. для практикующих врачей. М., Литтерра, 2003, 507.
2. Pisetsky D.S. Anti-DNA and autoantibodies. Curr. Opin. Rheumatol., 2000, 12, 364-368.
3. Villarreal G.M., Drenkard C., Villa A.R. et al. Prevalence of 13 autoantibodies and of the 16/6 and related pathogenic idiotypes in 465 patients with systemic lupus erythematosus and their relationship with disease activity. Lupus, 1997, 6, 425-435.
4. Amoura Z., Piette J.C., Bach J.F., Koutouzov S. The key role of nucleosomes in lupus. Arthr. Rheum. 1999, 42, 833-843.
5. Amoura Z., Koutouzov S., Piette J.C. The role of nucleosome in lupus. Curr. Opin. Rheumatol., 2000, 12, 369-373.
6. Burlingame R.W., Boey M.L., Starkebaum G., Rubin R.L. The central role of chromatin in autoimmune responses to histones and DNA in systemic lupus erythematosus. J. Clin. Invest., 1994, 94, 184-192.
7. Cairns A.P., McMillan S.A., Crockard A.D. et al. Antinucleosome antibodies in the diagnosis of systemic lupus erythematosus. Ann. Rheum. Dis., 2003, 62, 272-273.
8. Chirardello A., Doria A., Zampieri S. et al. Antinucleosome antibodies in SLE: a two-year follow-up study of 101 patients. J. Autoimmun., 2004, 22, 235 – 240.
9. Junkonen H., Salonen E.M., Walle T.K., Miettinen A. Anti-nucleosome antibodies in the diagnosis of systemic lupus erythematosus. Scan. J. Rheumatol., 2005, 34 (2), 122-124.
10. Min D.J., Kim S.J., Park S.H. et al. Anti-nucleosome antibodies: significance in lupus patients lacking anti-double-stranded DNA antibody. Clin. Exp. Rheumatol., 2002, 20, 13-18.
11. Simon J.A., Cabiedes J., Ortiz E. et al. Anti-nucleosome antibodies in patients with systemic lupus erythematosus of recent onset. Potential utility as a diagnostic tool and disease activity marker. Rheumatol., 2005, 43, 220-224.
12. Suer W., Dahnrich C., Schumberger W., Stocker W. Autoantibodies in SLE but not in scleroderma react with protein-stripped nucleosomes. J. Autoimmun. 2004, 22, 325-334.
13. Sallai K., Nagy E., Derfalvy B. et al. Antinucleosome antibodies and decreased deoxyribonuclease activity in sera of patients with systemic lupus erythematosus. Clin. Diagn. Labor. Immunol., 2005, Jan, 56-59.
14. Amoura Z., Chabre H., Koutouzov S. et al. Nucleosome-restricted antibodies are detected before anti-ds DNA and/or antihistones antibodies in serum of MRL-Mp lpr/lpr and +/+ mice and are present in kidney eluates of lupus mice with proteinuria. Arthr. Rheum., 1994, 37, 1684-1688.
15. Decker P. Nucleosome autoantibodies. Clin. Chim. Acta, 2006, 366, 48-60.
16. Насонова В.А. Системная красная волчанка. В кн. «Клиническая ревматология» (под ред. В.А.Насоновой, М.Г.Астапенко). М., 1989, 143-175.
17. Bombardier C., Gladman DD., Urowitz MB. et al. Derivation of the SLEDAI. Arthr. Rheum., 1992, 35, 6, 630-640.
18. Gladman DD., Ibanez D., Urowitz MB. SLEDAI 2000. J. Rheumatol., 2002;29:288-291.
19. Villalta D., Tozzori R., Bizzaro N. et al. The relevance of autoantigen source and cutoff definition in antichromatin (nucleosome) antibody immunoassays. Ann. N Y Acad. Sci., 2005, 1050, 176-184.
20. Vamvakas E.C. Meta-analyze of studies of the diagnostic accuracy of laboratory tests: a review of the concepts and methods. Arch. Pathol. Lab. Med., 1998, 122, 675 – 686.
21. Yin Su, Ru-Lin Jia, Lei Han, Zhan-Guo Li. Role of anti-nucleosome antibody in the diagnosis of systemic lupus erythematosus. Clin. Immunol., 2007, 122, 115–120.

Поступила 15.05.07

Abstract

M.A. Kotovskaya, S.K. Solovjov, N.Y. Nikishina, E.L. Nasonov

Clinical significance of antinucleosome antibodies in patients with “early” systemic lupus erythematosus

Objective. To assess clinical and diagnostic value of antibodies to nucleosome in «early» systemic lupus erythematosus (SLE).

Material and methods. 37 pts with «early» SLE were included. The control groups consisted of 36 pts with rheumatoid arthritis (RA), 31 pts with primary Sjogren's syndrome (SS) and 45 healthy subjects. Concentration of antibodies to nucleosome and to double stranded deoxyribonucleic acid (dsDNA) was measured with enzyme immunoassay (EIA).

Results. The level of antinucleosome antibodies in SLE pts ($64,5 \pm 53,7$ U/ml) was significantly higher than in RA and SS pts ($9 \pm 23,7$ U/ml; $p < 0,05$ и $15,7 \pm 11,5$ U/ml respectively; $p < 0,05$) or in donors ($8,3 \pm 5,2$ U/ml; $p < 0,05$). Correlation was found between level of antibodies to nucleosome and antibodies to dsDNA ($\chi^2 = 14,4$; $p < 0,05$). Sensitivity (87,5%) and specificity (95%) of antinucleosome antibodies were similar to anti-dsDNA antibodies (85,2% и 93% respectively). Simultaneous evaluation of antibodies to nucleosome and dsDNA provided 97 % specificity. There was a correlation between the level of antibodies to nucleosome and disease activity in SLE ($p < 0,0001$).

Conclusion. Evaluation of antinucleosome antibodies with EIA is a sensitive and specific serological test for early SLE diagnosis. The antibodies to nucleosome reflect activity of SLE

Key words: *antinucleosome antibodies, anti-dsDNA antibodies, systemic lupus erythematosus*