

КЛИНИКО-ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ И ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ IgG И СЫВОРОТКИ КРОВИ ПРИ СПОНДИЛОАРТРИТАХ

Кундер Е.В.¹, Волкова М.В.², Генералов И.И.²,
Невинский Г.А.³

¹ Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования», г. Минск

² Учреждение образования «Витебский государственный медицинский университет», г. Витебск

³ Учреждение Российской академии наук «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения РАН, г. Новосибирск

Резюме. Всего обследовано 266 пациентов со спондилоартритами и 69 здоровых лиц. Использовались сыворотки крови и IgG 1, 2 и 4 подклассов, выделенные из сыворотки крови комбинированным риванол-аффинно-хроматографическим методом. Контроль чистоты IgG проводили с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. ДНКазную активность сыворотки и IgG определяли методом, основанным на образовании сгустка субстрата 2-этокси-6,9-диаминоакридина лактатом. Различия между уровнями ДНКазной активности IgG и сыворотки крови у пациентов со спондилоартритами по сравнению с группой здоровых лиц оказались статистически высокозначимыми ($p < 0,0001$). При псориатическом артрите уровни ДНКазной активности IgG и сыворотки крови оказались выше ($p < 0,0001$), чем при реактивном артрите и анкилозирующем спондилите. Выявлены корреляции между ДНКазной активностью IgG, сывороточной ДНКазной активностью и клиническими признаками спондилоартритов, а также лабораторными данными. По результатам определения ДНКазной активности IgG и сыворотки крови разработаны тесты для дифференциальной диагностики заболеваний из группы спондилоартритов, соответствующие критериям полезных и наиболее полезных диагностических тестов в ревматологии.

Ключевые слова: спондилоартриты, поликлональные IgG, сыворотка крови, дезоксирибонуклеазная активность.

Kunder E.V., Volkova M.V., Generalov I.I., Nevinsky G.A.

CLINICAL AND DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE OF DEOXYRIBONUCLEASE ACTIVITY OF POLYCLONAL IgG AND BLOOD SERA IN PATIENTS WITH SPONDYLOARTHRITIS

Abstract. A group of 266 patients with spondyloarthritis and 69 healthy persons were included in our study. IgG preparations were isolated from blood sera by a combined rivanol/affine chromatography technique. Homogeneity of IgGs was tested by means of SDS-PAGE. Serum samples from patients and healthy persons, and IgG subclasses 1, 2 and 4 were tested for DNase activity. A method of DNase activity measurement was based on rivanol capacity to form a clot with DNA. We have found highly significant differences between the levels of DNase activity associated with IgG preparations and in blood sera from patients with spondyloarthritis, and healthy donors ($p < 0,0001$). DNase activity of IgG and sera in patients with psoriatic arthritis was higher than in patients with reactive arthritis and ankylosing

Адрес для переписки:

Кундер Елена Владимировна
220006, Республика Беларусь, г. Минск,
ул. Маяковского, 100-73.
Тел.: +375 (29) 677-82-20.
E-mail: elsid7@mail.ru

spondylitis ($p < 0,0001$). Multiple correlations were revealed between DNase activity of IgG, blood serum, clinical signs of psoriatic arthritis, reactive arthritis, ankylosing spondylitis, and laboratory findings. We have developed novel tests for differential diagnosis between various disorders, e.g., spondyloarthritis, based on IgG and serum-associated DNase activity, corresponding to the criteris of useful and very useful diagnostic tests in rheumatology. (*Med. Immunol.*, 2012, vol. 14, N 4-5, pp 337-346)

Keywords: spondyloarthritis, polyclonal IgG, blood serum, deoxyribonuclease activity.

Введение

Спондилоартриты (СпА) представляют собой значимую медико-социальную проблему, связанную с существенным влиянием не только на экономическое состояние общества в целом, но и на качество жизни каждого отдельного индивидуума [9]. Результаты эпидемиологических исследований свидетельствуют о неуклонном и повсеместном увеличении числа случаев заболеваемости СпА [8]. Основными представителями данной группы заболеваний являются псориатический артрит (ПА), реактивный артрит (РеА), анкилозирующий спондилит (АС). Общеизвестным фактом являются объективные трудности своевременной верификации СпА [12, 14].

Перспективными следует признать новые, не имеющие аналогов направления изучения СпА. Примером подобного направления является абзимология – наука о каталитических антителах (абзимах) [19]. Каталитические антитела активно изучаются при многих ревматических и кардиологических заболеваниях [1, 2, 7].

Принимая во внимание существование взаимосвязи между каталитической активностью иммуноглобулинов и сыворотки крови, а также учитывая трудоемкость прямого определения различных видов абзимной активности [4], представляют значительный интерес исследования, посвященные изучению сывороточной каталитической активности деполимеризующего действия (ДНКазной и гиалуронидазной) при различных ревматических и кардиологических заболеваниях [17, 20]. Однако до настоящего времени не проведен сравнительный анализ указанных видов каталитической активности сыворотки крови при заболеваниях из группы СпА.

Целью исследования стало изучение каталитической активности иммуноглобулинов, а также сывороточной каталитической активности при СпА для установления механизмов их развития и разработки новых способов дифференциальной диагностики.

Материалы и методы

Всего в исследовании приняло участие 266 пациентов со СпА (95 – с ПА, 120 – с РеА и 51 – с АС). Контрольную группу составили 69 практически здоровых лиц. Принадлежность за-

болеваний к СпА устанавливалась в соответствии с критериями ESSG [13]. Аксиальный и периферический СпА классифицировали в соответствии с критериями ASAS [20, 21]. Диагноз ПА выставлялся согласно критериям CASPAR [25]. Диагноз РеА устанавливался с использованием предварительных Международных критериев [10]. Диагноз АС верифицировался в соответствии с модифицированными Нью-Йоркскими критериями [26]. В сравниваемых группах не выявлено различий по полу и возрасту ($p > 0,05$).

В группе пациентов с ПА 38 пациентов (40%) имели признаки аксиального СпА, а 57 пациентов (60%) – периферического СпА. Средняя длительность суставного синдрома составила $6,57 \pm 5,30$ года (95% ДИ: 5,48–7,64). Все пациенты с ПА получали терапию нестероидными противовоспалительными препаратами (НПВП), средняя длительность которой составила $4,63 \pm 3,98$ года (95% ДИ: 3,82–5,44), а 42 пациента (44,21%) регулярно принимали метотрексат (7,5–15 мг еженедельно), средняя длительность базисной терапии составила $4,61 \pm 4,12$ года (95% ДИ: 3,33–5,89).

В группе пациентов с РеА признаки аксиального СпА имели 39 пациентов (32,50%), а 81 пациент (67,5%) имели признаки периферического СпА. Из экстраартикулярных проявлений наблюдался конъюнктивит – у 11 пациентов (9,17%), увеит – у 2 (1,66%), иридоциклит – у 3 (2,50%), кератодермия – у 1 (0,83%), лихорадка – у 10 (8,33%). Диагностика хламидийной инфекции осуществлялась культуральным методом, ПЦР, ИФА и РИФ. Изолированная хламидийная инфекция диагностирована у 98 пациентов (81,67%), хламидийная инфекция и трихомониаз – у 12 (10,00%), хламидийная, уреоплазменная инфекция и трихомониаз – у 10 (8,33%). Средняя длительность болезни в данной группе составила 0,5 года (Min 0,05 Max 8,0) (95% ДИ: 0,49–0,8). Все пациенты с РеА принимали НПВП. Средняя длительность терапии НПВП составила 0,1 года (Min 0,0 Max 8,0).

В группе пациентов с АС центральную форму заболевания имели 36 человек (70,58%), ризомелическую – 7 (13,73%), периферическую – 8 (15,69%). У всех пациентов наблюдался сакроилеит не менее 2-ой рентгенологической стадии. Средняя величина BASDAI составила $61,82 \pm 14,34$

(95% ДИ: 57,79-65,85), BASRI — $8,86 \pm 2,11$ (95% ДИ: 8,27-9,46), BASFI — $68,87 \pm 19,57$ (95% ДИ: 63,36-74,37), MASES — $5,57 \pm 2,43$ (95% ДИ: 4,89-6,25). Средняя длительность болезни в данной группе пациентов составила $11,85 \pm 8,23$ года (95% ДИ: 9,58-14,11). Все пациенты с АС получали НПВП, средняя длительность лечения — 2,5 года (Min 0,0 Max 15,0) (95% ДИ: 2,0-5,0). Базисное лечение сульфасалазином (2,0 г ежедневно) получали 8 пациентов (15,69%). Средняя длительность базисной терапии равнялась $4,25 \pm 3,12$ года (95% ДИ: 2,29-6,47).

В качестве материала была использована сыворотка крови и IgG 1, 2 и 4 подклассов, выделенная из сыворотки крови пациентов и здоровых лиц. Препараты IgG из сыворотки крови выделяли комбинированным риванол-аффинно-хроматографическим методом [6]. Контроль чистоты полученных IgG проводили с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в диссоциирующих и восстанавливающих условиях. Определяли ДНКазную активность IgG на 1 мг образца (удельная активность IgG). Удельную ДНКазную активность IgG выражали в баллах. Определяли также каталитическую активность IgG на 1 мл сыворотки крови путем умножения удельной каталитической активности IgG на концентрацию IgG в сыворотке крови в мг/мл. ДНКазную активность IgG на 1 мл сыворотки крови выражали в баллах/мл. Сывороточную ДНКазную активность выражали в баллах. ДНКазную активность IgG определяли методом, основанным на образовании и осаждении сгустка субстрата 2-этоксиг-6,9-диаминоакридина лактатом (риванолом). В состав реакционной смеси входили IgG в концентрации 1 мг/мл в 0,1 мл пробы, 0,1 мл 0,02M трис-HCl буферного раствора pH 7,4, содержащего 0,01 M раствор хлорида магния и 0,2 мл раствора ДНК в концентрации 300 мкг/мл. Реакция ставилась в дублях. Затем осуществлялась инкубация при 37 °C в течение 20 часов. Учет результатов производился визуально после добавления в пробы по 20 мкл 0,75% раствора риванола по величине образовавшихся сгустков нераспавшейся ДНК. В контрольные пробы вместо препаратов антител вносили 0,1 мл 0,9% раствора хлорида натрия. Количественный учет производился в баллах. Отсутствие активности (сгусток ДНК) принимали за 0 баллов, минимальная активность (рыхлый сгусток) — 1 балл, слабая активность (рыхлый сгусток, хлопья, нити ДНК) — 2 балла, умеренная активность (хлопья, нити) — 3 балла, высокая активность (хлопья, нити, распад сгустка) — 4 балла и распад сгустка ДНК (очень высокая активность) — 5 баллов [5].

Концентрацию общего IgG в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анали-

за (ИФА) с использованием набора «IgG общий — ИФА-БЕСТ» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия).

Статистический анализ результатов исследования выполнялся с использованием аналитического пакета Statistica 7.0 и программы MedCalc Statistics 10.2.00. Для анализа распределения данных использовали Shapiro-Wilk's тест. В случае нормального распределения данные представляли в виде среднее значение (M) \pm стандартное отклонение (SD). В случае ненормального распределения данные были выражены как медиана (Me), ранг (Min-Max) и межквартильный интервал (25th and 75th percentiles). Для оценки статистических различий средних величин и медиан использовали Student's t-тест и Mann-Whitney's U-тест соответственно. Для анализа относительных значений использовали критерий χ^2 . Корреляционный анализ производили при помощи метода Spearman. Для оценки диагностической точности разработанных лабораторных тестов выполнялся ROC-анализ и проводился расчет операционных характеристик тестов [3].

Результаты

Электрофоретический анализ выполнялся по методу Леммли в 3-16% ПААГ в диссоциирующих условиях в присутствии ДДС-Na (рис. 1А) и в редуцирующем 12% геле (рис. 1Б). Результаты проведенных электрофорезов подтвердили чистоту полученных препаратов IgG.

Дополнительно наличие собственной ДНКазной активности у IgG было подтверждено электрофорезом продуктов распада ДНК под действием IgG в концентрации 0,1 мг/мл в 1,5-2% агарозном геле. Использовалась суперскрученная плазмидная ДНК ((sc) pBluescript plasmid DNA) (рис. 2). Результаты эксперимента подтвердили наличие у препаратов IgG ДНКазной активности.

Результаты определения ДНКазной активности IgG

Выявлены наиболее высокие уровни ($p < 0,0001$) ДНКазной активности IgG при ПА по сравнению с РеА и АС (табл. 1).

Статистически значимыми оказались различия между частотами встречаемости положительных результатов определения удельной ДНКазной активности (1 балл и более) у пациентов с ПА и РеА ($p = 0,035$), РеА и АС ($p = 0,0018$). Выявлены статистически высокозначимые различия между данными показателями у пациентов с ПА и АС ($p < 0,0001$) (табл. 2).

У пациентов с ПА установлена зависимость ($p < 0,05$) между удельной ДНКазной активностью IgG и наличием синовитов ($r = 0,35$). При РеА обнаружена взаимосвязь ($p < 0,05$) между удельной

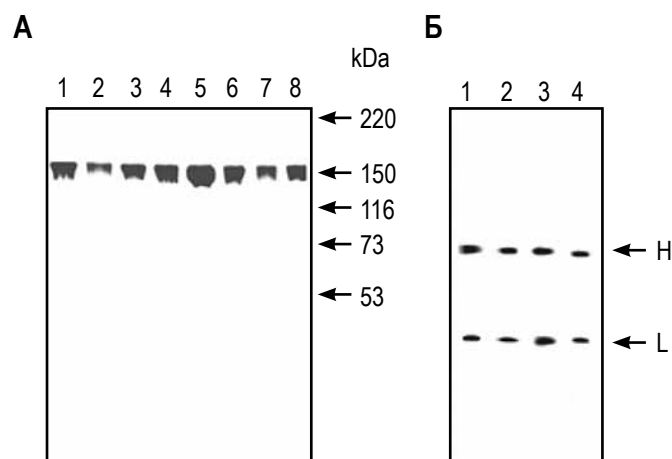


Рисунок 1. Электрофорез выделенных препаратов IgG в ПААГ, окраска серебром

Примечание. А – результаты электрофореза в диссоциирующих условиях: треки 1-8 – пробы иммуноглобулинов, выделенных от пациентов, стрелками указаны позиции маркеров молекулярного веса. Выделенные препараты мигрируют в зоне 150 кДа, что соответствует молекулярному весу иммуноглобулинов.

В – результаты электрофореза в редуцирующем 12% геле: 1-4 препараты иммуноглобулинов, выделенных от пациентов, H – тяжелые цепи иммуноглобулинов, L – легкие цепи иммуноглобулинов.

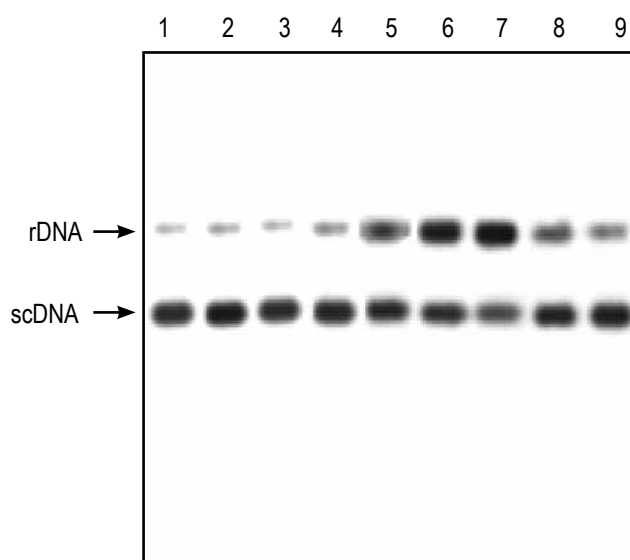


Рисунок 2. Результаты электрофореза продуктов распада суперскрученной плазмидной ДНК под действием IgG

Примечание. 1 – ДНК, 2-3 – ДНК с IgG в концентрации 1 мг/мл из сыворотки здоровых лиц; 4 – ДНК с IgG от пациента с реактивным артритом; 5-6, 8-9 – ДНК с IgG от пациентов с различными инфекционными заболеваниями, rDNA – релаксированная форма плазмидной ДНК, scDNA – суперскрученная форма плазмидной ДНК.

ДНКазной активностью IgG и активностью заболевания ($r = 0,43$), концентрацией С-реактивного белка ($r = 0,38$), количеством Т-лимфоцитов ($r = 0,35$), числом CD4⁺Т-лимфоцитов ($r = 0,40$), уровнем СОЭ ($r = 0,42$), между ДНКазной активностью IgG на 1 мл сыворотки крови и количеством циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) ($r = 0,38$). У пациентов с АС установлена зависимость ($p < 0,05$) между ДНКазной активностью IgG на 1 мл сыворотки крови и стадией спондилита ($r = 0,34$), величиной BASRI

($r = 0,37$), расстоянием «затылок-стена» ($r = 0,4$), экскурсией грудной клетки ($r = -0,4$), величиной бокового наклона позвоночника ($r = -0,39$), фагоцитарным числом ($r = -0,5$).

С учетом выявленных нами различий между уровнями ДНКазной активности IgG у пациентов с ПА, РеА и АС, разработаны тесты дифференциальной диагностики данных заболеваний, а именно ПА и РеА, а также ПА и АС, соответствующие критериям полезных и наиболее полезных тестов для диагностики ревматической

ТАБЛИЦА 1. УРОВНИ ДНКазной АКТИВНОСТИ IgG

Группы обследованных лиц	Уровни удельной ДНКазной активности IgG, баллы				
	Медиана	Размах (min-max)	95% ДИ для медианы	Межквартильный интервал	Число наблюдений
Все пациенты	2,50*	0,00-5,00	2,50-3,00	1,50-3,50	266
ПА	3,50*	1,00-5,00	3,29-3,71	3,00-4,00	95
РеА	2,50*	0,00-5,00	2,00-2,56	1,50-3,00	120
АС	1,50*	0,00-4,00	1,00-1,50	1,00-2,00	51
Здоровые лица	0,00	0,00-2,50	0,00-0,50	0,00-0,50	69
	Уровни ДНКазной активности IgG на 1 мл сыворотки крови, баллы/мл				
Все пациенты	30,00*	0,00-240,00	25,98-33,60	15,00-54,00	266
ПА	56,00*	12,00-240,00	45,00-62,71	34,10-73,13	95
РеА	23,23*	0,00-130,00	18,00-30,26	14,40-41,70	120
АС	12,00*	0,00-65,00	6,04-20,71	4,71-25,99	51
Здоровые лица	0,00	0,00-15,30	0,00-2,29	0,00-4,24	69

Примечание. * – $p < 0,0001$ (по сравнению с группой здоровых лиц).

ТАБЛИЦА 2. ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УДЕЛЬНОЙ ДНКазной АКТИВНОСТИ IgG У ОБСЛЕДОВАННЫХ ЛИЦ

Группы обследованных лиц	Частоты встречаемости положительных результатов определения удельной ДНКазной активности IgG		
	%	95% ДИ	Число наблюдений
Все пациенты	93,61*	90,67-96,55	266
ПА	100,00*	100,00-100,00	95
РеА	95,00*	91,10-98,90	120
АС	78,43*	67,14-89,72	51
Здоровые лица	23,19	13,23-33,15	69

Примечание. * – $p < 0,0001$ (по сравнению с группой здоровых лиц).

патологии [16]. Исходя из полученных результатов, удельная ДНКазная активность IgG равная 3 баллам («cut-off») и более, может служить дополнительным признаком ПА в случае дифференциальной диагностики между ПА и РеА, при этом площадь под ROC-кривой равняется 0,77 (95% ДИ: 0,71-0,83) ($p < 0,0001$). Удельная ДНКазная активность IgG равная 2,5 баллам («cut-off») и более, является дополнительным признаком ПА при дифференциальной диагностике между ПА и АС, при этом площадь под ROC-кривой равняется 0,93 (95% ДИ: 0,87-0,96) ($p < 0,0001$). При определении ДНКазной активности IgG на 1 мл сыворотки крови равной 26,95 баллов/мл («cut-off») и более можно провести дифференциаль-

ную диагностику между ПА и РеА в пользу ПА, при этом площадь под ROC-кривой равняется 0,78 (95% ДИ: 0,72-0,84) ($p < 0,0001$). ДНКазная активность IgG на 1 мл сыворотки крови, равная 27,5 баллам/мл («cut-off») и более, является дополнительным признаком ПА при дифференциальной диагностике между ПА и АС, при этом площадь под ROC-кривой равняется 0,92 (95% ДИ: 0,86-0,96) ($p < 0,0001$).

Показатели операционных характеристик тестов дифференциальной диагностики ПА и РеА, а также ПА и АС по результатам определения ДНКазной активности IgG представлены в таблице 3.

ТАБЛИЦА 3. ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТОВ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ПА, РеА И АС ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДНКазной АКТИВНОСТИ IgG

Характеристики теста	Результаты определения удельной ДНКазной активности IgG		Результаты определения ДНКазной активности IgG на 1 мл сыворотки крови	
	ПА и РеА	ПА и АС	ПА и РеА	ПА и АС
Диагностическая чувствительность	61,05% (95% ДИ: 50,50-70,90)	78,95% (95% ДИ: 69,40-86,60)	85,26% (95% ДИ: 76,50-91,70)	84,21% (95% ДИ: 75,30-90,90)
Диагностическая специфичность	79,17% (95% ДИ: 70,80-86,00)	92,16% (95% ДИ: 81,10-97,80)	57,50% (95% ДИ: 48,10-66,50)	86,27% (95% ДИ: 73,70-94,30)
Предсказательная ценность положительная	69,90%	94,90%	61,40%	92,00%
Предсказательная ценность отрицательная	72,00%	70,10%	83,10%	74,60%
Диагностическая эффективность	68,37%	87,67%	69,30%	84,25%
Отношение правдоподобия положительного результата (ОП+)	2,93	10,07	2,01	6,14
Отношение правдоподобия отрицательного результата (ОП-)	0,49	0,20	0,26	0,18

ТАБЛИЦА 4. УРОВНИ ДНКазной АКТИВНОСТИ СЫВОРОТКИ КРОВИ

Группы обследованных лиц	Уровни ДНКазной активности сыворотки крови, баллы				
	Медиана	Размах (min-max)	95% ДИ для медианы	Межквартильный интервал	Число наблюдений
Все пациенты	3,00*	0,00-5,00	3,00-3,00	2,00-4,00	266
ПА	4,00*	2,00-5,00	4,00-4,42	4,00-5,00	95
РеА	3,00*	1,00-5,00	2,00-3,00	2,00-3,00	120
АС	2,00*	0,00-4,00	1,00-2,00	1,00-2,00	51
Здоровые лица	1,00	0,00-3,00	1,00-2,00	1,00-2,00	69

Примечание. * – $p < 0,0001$ (по сравнению с группой здоровых лиц).

Результаты определения сывороточной ДНКазной активности

Различия между уровнями ДНКазной активности сыворотки крови у пациентов с ПА и РеА, ПА и АС, РеА и АС оказались статистически высокозначимыми ($p < 0,0001$) (табл. 4).

Статистически высокозначимыми оказались различия между частотами встречаемости положительных результатов определения ДНКазной активности сыворотки крови (2 балла и более) у пациентов с ПА и РеА ($p = 0,0064$), ПА и АС ($p < 0,0001$), РеА и АС ($p < 0,0001$) (табл. 5).

У пациентов с ПА обнаружена взаимосвязь между ДНКазной активностью сыворотки крови и выраженностью боли в суставах по ВАШ ($r = 0,48$), скованностью движений в суставах ($r = 0,47$), числом воспаленных суставов ($r = 0,46$), между ДНКазной активностью сыворотки крови и удельной ДНКазной активностью IgG ($r = 0,63$). При РеА выявлена зависимость ($p < 0,05$) между ДНКазной активностью сыворотки крови и удельной ДНКазной активностью IgG ($r = 0,64$), ДНКазной активностью сыворотки крови и ДНКазной активностью IgG на 1 мл сы-

ТАБЛИЦА 5. ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДНКазной АКТИВНОСТИ СЫВОРОТКИ КРОВИ У ОБСЛЕДОВАННЫХ ЛИЦ

Группы обследованных лиц	Частоты встречаемости положительных результатов определения ДНКазной активности сыворотки крови		
	%	95% ДИ	Число наблюдений
Все пациенты	89,10*	85,35-92,84	266
ПА	100,00*	100,00-100,00	95
РеА	92,50*	87,79-97,21	120
АС	60,78*	47,38-74,18	51
Здоровые лица	42,03	30,38-53,68	69

Примечание. * – $p < 0,0001$ (по сравнению с группой здоровых лиц).

ТАБЛИЦА 6. ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТОВ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ПА, РЕА И АС ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДНКазной АКТИВНОСТИ СЫВОРОТКИ КРОВИ

Характеристики теста	ПА и РеА	ПА и АС
Диагностическая чувствительность	84,21% (95% ДИ: 75,30-90,90)	84,21% (95% ДИ: 75,30-90,90)
Диагностическая специфичность	86,67% (95% ДИ: 79,20-92,20)	94,12% (95% ДИ: 83,70-98,70)
Предсказательная ценность положительная	83,30%	96,40%
Предсказательная ценность отрицательная	87,40%	76,20%
Диагностическая эффективность	68,37%	90,41%
Отношение правдоподобия положительного результата теста (ОП+)	6,32	14,32
Отношение правдоподобия отрицательного результата теста (ОП-)	0,18	0,17

сыворотки крови ($r = 0,47$). Отсутствуют различия ($p > 0,05$) между уровнями ДНКазной активности IgG и сывороточной ДНКазной активности у обследованных лиц мужского и женского пола, а также у пациентов с ПА и АС, получавших и не получавших базисную терапию.

С учетом выявленных нами различий между уровнями сывороточной ДНКазной активности у пациентов с ПА, РеА и АС, разработаны тесты дифференциальной диагностики данных заболеваний, соответствующие критериям наиболее полезных тестов для диагностики ревматической патологии [16]. При определении сывороточной ДНКазной активности, равной 3 баллам («cut-off») и более, можно провести дифференциальную диагностику между ПА и РеА в пользу ПА, при этом площадь под ROC-кривой равняется 0,89 (95% ДИ: 0,84-0,93) ($p < 0,0001$). ДНКазная активность сыворотки крови, равная 3 баллам («cut-off») и более, является дополнительным признаком ПА при дифференциальной диагностике между ПА и АС, при этом площадь под

ROC-кривой равняется 0,93 (95% ДИ: 0,87-0,96) ($p < 0,0001$). Показатели операционных характеристик тестов дифференциальной диагностики ПА и РеА, а также ПА и АС по результатам определения сывороточной ДНКазной активности представлены в таблице 6.

Обсуждение

Согласно литературным данным [4], наиболее высокие уровни ДНКазной абзимной активности наблюдаются при аутоиммунных заболеваниях, а величина данного вида активности коррелирует с показателями воспаления и степени тяжести аутоиммунного процесса [7].

В нашем исследовании при ПА ДНКазная активность IgG оказалась выше, чем при РеА и АС, что подтверждает представление о ПА как о прогрессирующем системном аутоиммунном процессе, при котором наблюдаются выраженные иммунопатологические сдвиги. Принимая во внимание данные о выявлении при псориазе

антинуклеарных антител, антител к двухспиральной ДНК, антиперинуклеарных антител [11], нельзя исключить, что абзимы с ДНКазной активностью, появляясь на ранних этапах заболевания, имеют приспособительное значение, разрушая избыток нуклеиновых кислот, появляющихся в процессе цитолиза. На дальнейших этапах развития заболевания антитела, обладающие ДНКазной активностью, могут оказывать непосредственное повреждающее воздействие на ткани, реализуя свои цитотоксические эффекты [22].

Версия о возможном участии абзимов, обладающих ДНКазной активностью, в процессах апоптоза [18] при ПА имеет особое значение, т.к. при псориазе происходят нарушения апоптотического процесса, являющиеся одной из причин гиперпролиферации в эпидермисе.

Выявленная в нашем исследовании зависимость ДНКазной активности поликлональных IgG и клинических признаков заболеваний подтверждает клиническую значимость абзимов, обладающих ДНКазной активностью, при данной патологии. При ПА обнаружена зависимость ДНКазной активности IgG и наличия экссудативных явлений в суставах. Данный результат подтверждает тот факт, что повышенная ДНКазная активность IgG является признаком активного воспалительного процесса при ПА и, вероятно, может свидетельствовать о недостаточно активном терапевтическом вмешательстве. Прямая зависимость ДНКазной активности IgG и стадии спондилита, индекса BASRI, расстояния «затылок-стена», а также обратная зависимость ДНКазной активности IgG, экскурсии грудной клетки и величины бокового наклона указывает на то, что при прогрессировании АС нарастает иммуновоспалительный ответ, сопровождающийся повышением ДНКазной абзимной активности. Зависимость ДНКазной активности IgG и показателей иммунограммы (количество Т-лимфоцитов и CD4⁺Т-лимфоцитов, фагоцитарное число при АС) свидетельствует об участии абзимов в иммунопатологических процессах при данных заболеваниях.

При РеА отмечена связь ДНКазной активности IgG и уровня СОЭ, а также сывороточной концентрации С-реактивного белка, что указывает на возможность использования определения ДНКазной активности поликлональных IgG как маркера активности воспалительного процесса.

Отсутствие различий между уровнями ДНКазной активности IgG и сывороточной ДНКазной активности у пациентов, получавших и не получавших базисную терапию, свидетельствует о том, что метотрексат и сульфасалазин не ока-

зывают существенного влияния на данные виды ДНКазной активности.

Нами впервые разработаны диагностические тесты на основе определения ДНКазной активности IgG и сывороточной ДНКазной активности с расчетом их операционных характеристик. Оказалось, что выявление ДНКазной активности выше некоторой пороговой величины является критическим для установления диагноза ПА. Согласно рекомендациям Американской коллегии ревматологов [16, 21], наиболее полезными для диагностики ревматических заболеваний являются лабораторные тесты с ОП+ > 5 и ОП- < 0,2; полезными – с ОП+ > 2 и ≤ 5, ОП- > 0,2 и ≤ 0,5; не имеющими пользы – с ОП+ ≤ 2 и ОП- > 0,5. Таким образом, тесты дифференциальной диагностики ПА и РеА по результатам определения удельной ДНКазной активности IgG, а также ДНКазной активности IgG на 1 мл сыворотки крови соответствуют критериям полезных диагностических тестов, а тесты дифференциальной диагностики ПА и АС по результатам определения удельной ДНКазной активности IgG и ДНКазной активности IgG на 1 мл сыворотки крови соответствуют критериям наиболее полезных диагностических тестов. Тесты дифференциальной диагностики ПА и РеА, а также ПА и АС по результатам определения уровней ДНКазной активности сыворотки крови соответствуют критериям наиболее полезных диагностических тестов.

Исследования проведены по теме ГНТП 01.12 «Лечебные и диагностические технологии», подпрограмма «Терапия» (2006-2008 гг.), а также при поддержке БРФФИ (№ Б03-345), РФФИ-БФФИ (04-04-81017).

Заключение

У пациентов со СпА (ПА, РеА и АС) доказано наличие поликлональных IgG, обладающих собственной ДНКазной активностью, уровни которой статистически высокозначимо превышают контрольные величины. Установлено превышение уровней ДНКазной активности IgG у пациентов с ПА по сравнению с величинами данного показателя у пациентов с РеА и АС.

При СпА (ПА, РеА и АС) установлено статистически высокозначимое преобладание уровней сывороточной ДНКазной активности по сравнению с величинами данных показателей у здоровых лиц. При этом уровень сывороточной ДНКазной активности у пациентов с ПА оказался в 1,3 раза выше, чем у пациентов с РеА, и в 2 раза выше, чем у пациентов с АС.

Патогенетическую значимость ДНКазных абзимов при ПА, РеА и АС подтверждают выявленные взаимосвязи между уровнями ДНКазной

активности IgG и маркерами активности заболеваний. Клиническую значимость абзимной, а также сывороточной ДНКазной активности при изученных вариантах СПА подтверждают взаимосвязи между их величинами и клиническими признаками заболеваний. Обнаруженные взаимосвязи подтверждают участие ДНКазной активности IgG, а также сывороточной ДНКазной активности в развитии воспаления.

На основе определения ДНКазной активности IgG, а также ДНКазной активности сыворотки крови разработаны тесты дифференциальной диагностики ПА, РеА и АС, соответствующие критериям полезных и наиболее полезных диагностических тестов в ревматологии.

Список литературы

1. Генералов И.И., Сидорская Е.В. Абзимная активность препаратов IgG у больных ревматоидным артритом и системной красной волчанкой // Иммунология. — 1998. — № 3. — С. 54-56.
2. Мальцев К.А., Хитров А.Н., Введенская О.Ю., Пономаренко Н.А., Исаева М.А., Кимова М.В., Третьяк Е.Б., Шогенов З.С., Алекберова З.С., Габиров А.Г., Сучков С.В. Каталитические аутоантитела — новый молекулярный инструмент в кардиологии и офтальмологии // Тер. архив. — 2006. — № 11. — С. 70-76.
3. Насонов Е.Л., Александрова Е.Н. Современные стандарты лабораторной диагностики ревматических заболеваний. Москва, 2006. — 70 с.
4. Невинский Г.А., Канышкова Т.Г., Бунева В.Н. Природные каталитически активные антитела (абзимы) в норме и при патологии // Биохимия. — 2000. — № 65. — С. 1245-1255.
5. Способ определения ДНКазной активности: пат. 243А Респ. Беларусь, МПК С12 Q1/34, С 12 N 9/22 / К.С. Азаренок, И.И. Генералов, А.Г. Голубева, Н.В. Железняк, М.Р. Конорев; 1996. — № 3. — С. 174.
6. Способ очистки иммуноглобулинов класса G из сыворотки крови и устройство для аффинной хроматографии: пат. 3205 Респ. Беларусь, МПК 6G 01 N 33/48 / М.Р. Конорев, И.И. Генералов, И.В. Жильцов, А.Г. Генералова; 1999. — № 3. — С. 121.
7. Хитров А.Н. ДНК-абзимы при ревматоидном артрите: патогенетическое и клиническое значение // Тер. архив. — 2005. — № 77. — С. 75-80.
8. Akkoc N. Are spondyloarthropathies as common as rheumatoid arthritis worldwide? // Curr. Rheumatol. Rep. — 2008. — Vol. 10. — P. 371-378.
9. Bergman M.J. Social and economic impact of inflammatory arthritis // Postgrad. Med. — 2006. — Vol. 5. — P. 8-11.
10. Braun J., Kingsley G., van der Heijde D., Sieper J. On the difficulties of establishing a consensus on the definition of and diagnostic investigations for reactive arthritis. Results and discussion of a questionnaire prepared for the 4th International Workshop on Reactive arthritis // J. Rheumatol. — 2000. — Vol. 27. — P. 2185-2192.
11. Calzavara-Pinton P.G., Franceschini F., Manera C. Incidence of antiperinuclear factor in patients with psoriatic arthritis // Adv. Exp. Med. Biol. — 1999. — Vol. 455. — P. 215-220.
12. Chen C.H., Yu D.T., Chou C.T. Biomarkers in spondyloarthropathies // Adv. Exp. Med. Biol. — 2009. — Vol. 649. — P. 122-132.
13. Dougados M., van der Linder S., Juhlin R., Huitfeldt B., Amor B., Calin A., Cats A., Dijkmans B., Olivieri I., Pasero G. The European Spondyloarthropathy Study Group preliminary criteria for classification of spondyloarthropathy // Arthritis Rheum. — 1991. — Vol. 34. — P. 1218-1227.
14. Healy P.J., Helliwell P.S. Classification of the spondyloarthropathies // Curr. Opin. Rheumatol. — 2005. — Vol. 17. — P. 393-395.
15. Johnson S.R., Schentag C.T., Gladman D.D. Autoantibodies in biological agents naïve patients with psoriatic arthritis // Ann. Rheum. Dis. — 2005. — Vol. 64. — P. 770-772.
16. Kavanaugh A., Solomon D.H., Schur P., American college of rheumatology ad hoc committee on immunologic testing guidelines Guidelines for immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: an introduction // Arthritis Rheum. — 2002. — Vol. 47. — P. 429-433.
17. Kawai Y., Yoshida M., Arawaka K., Kumamoto T., Morikawa N., Masamura K., Tada H., Ito S., Hoshizaki H., Oshima S., Taniguchi K., Terasawa H., Miyamori I., Kishi K., Yasuda T. Diagnostic Use of Serum Deoxyribonuclease I Activity as a Novel Early-Phase Marker in Acute Myocardial Infarction // Circulation. — 2004. — Vol. 109. — P. 2398-2400.
18. Kozyr A.V., Kolesnikov A.V., Zelenova N.A., Sashenko L.P., Mikhailap S.V., Bulina M.E., Ignatova A.N., Favorov P.V., Gabibov A.G. Autoantibodies to nuclear antigens: correlation between cytotoxicity and DNA-hydrolyzing activity // Appl. Biochem Biotechnol. — 2000. — Vol. 83. — P. 255-268.
19. Rader C., List B. Catalytic antibodies as magic bullets // Chemistry. — 2000. — Vol. 12. — P. 2091-2095.
20. Sallai K., Nagy E., Derfalvy B., Muzes G., Gergely P. Antinucleosome antibodies and decreased deoxyribonuclease activity in sera of patients with systemic lupus erythematosus // Clinical and

Diagnostic Laboratory Immunology. – 2005. – Vol. 1. – P. 56-59.

21. Shojania K. What laboratory tests are needed? // CMAJ. – 2000. – Vol. 162. – P. 743-746.

22. Suchkov S.V., Gabibiv A.G., Gnuchev N.V. Phenomenon of DNA-abzyme cross-reactivity and its significance for the mechanisms of cytotoxicity and apoptosis // Ontogenez. – 2001. – Vol. 32. – P. 348-352.

23. Taylor W., Gladman D.D., Helliwell P., Marchesoni A., Mease P., Mielants H. CASPAR Study Group. Classification criteria for psoriatic

arthritis: development of new criteria from a large international study // Ann. Rheum. Dis. – 2006. – Vol. 54. – P. 2665-2673.

24. Van der Linder S., Valkenburg H.A., Cat Valkenburgs A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis: a proposal for modification of the New York criteria // Arthritis Rheum. – 1984. – Vol. 2. – P. 361-368.

поступила в редакцию 13.12.2011

отправлена на доработку 06.01.2012

принята к печати 09.01.2012