

Вохмянина Н.В.

Деаминированные пептиды глиадина. Оптимальный подход к диагностике целиакии

ГКУЗ «Диагностический центр (медико-генетический)», г. Санкт-Петербург

Vokhmyanina N. V.

Deaminated gliadin peptides. The optimal approach to the diagnosis of celiac disease

Резюме

Исследовались антитела к деаминированным пептидам глиадина (ДПГ) и тканевой трансглутаминазе (тТГ) у пациентов в разных группах: впервые выявленная целиакия (18), больные целиакией, находящиеся на лечении (45) и пациенты без целиакии (50). Анализ результатов показал высокую диагностическую эффективность при совокупном использовании этих тестов, комбинированная специфичность которых позволяет заменить проведение биопсии.

Ключевые слова: целиакия, антитела к деаминированным пептидам глиадина, тканевая трансглутаминаза, антиглиадиновые антитела, эффективность диагностики.

Summary

In this study is investigate antibodies to tissue transglutaminase (tTG) and deamidated gliadin peptide (DGP) in 18 untreated, 45 treated celiac disease patients and in 50 nonceliac controls. Combinations of two tests, including a DGP/tTG, might be able to diagnose CD accurately in different clinical scenarios making biopsy avoidable.

Keywords: Celiac disease, deamidated gliadin peptide antibodies, Tissue transglutaminase, Antigliadin antibodies, Diagnostic accuracy

Введение

Целиакия (глютенчувствительная энтеропатия) – заболевание, которое характеризуется пожизненным нарушением толерантности к растительным белкам клейковины злаковых культур, приводящее к диффузной атрофии слизистой тонкого кишечника и развитию синдрома мальабсорбции. Высокая частота (1% от численности популяции), тяжелое прогрессирующее течение, отсутствие эффективных ранних маркеров и мер профилактики объясняют пристальное внимание к глютенчувствительной энтеропатии [1].

В 80-х годах прошлого столетия для диагностики ЦЛ стали активно использоваться высокоспецифичные (сывороточные, морфометрические, генетические) маркеры, которые способствовали своевременному выявлению целиакии (ЦЛ), не допуская тяжелой манифестации болезни, что привело к преобладанию атипичных форм ЦЛ и обозначило проблему недиагностируемой целиакии. В настоящее время процент не диагностируемой целиакии у взрослых составляет 59%, у детей 40% [2]. Значительный вклад в проблему не диагностируемой целиакии вносят сывороточные маркеры целиакии. Выявленные недостатки, например, прямая зависимость чувствительности серологических тестов от степени поражения слизистой тонкого кишечника, объяснили возможность получения

недостовверных результатов на ранней стадии болезни и при атипичных формах целиакии (латентная, потенциальная), не сопровождающиеся характерными для ЦЛ морфологическими повреждениями в слизистой оболочке тонкого кишечника (СОТК) [3]. За последнее время, благодаря накопленной информации, установлено, что «золотой стандарт» диагностики ЦЛ (морфометрические маркеры) недостаточно специфичен для выявления атипичных форм и ранней ЦЛ [4]. В связи с этим, акцент в диагностике переместился на сывороточные методы с минимальным привлечением эзофагогастродуоденоскопии (ЭГДС). Актуальность совершенствования серологической диагностики привела к новому маркеру (антитела к деаминированным пептидам глиадина - ДПГ), который в настоящее время признан эффективным маркером для диагностики атипичных форм и ранней ЦЛ. Во многих странах Европы эти маркеры уже активно используются для выявления целиакии, успешно заменяя недостаточно специфичные антиглиадиновые антитела (АГА) [5]. В России до сих пор ДПГ не изучались и широко не применяются в практической медицине для диагностики ЦЛ.

Цель исследования

Провести определение ДПГ в определенных группах пациентов. Оценить диагностическую значимость ДПГ для выявления целиакии.

Таблица 1. Характеристики лабораторных показателей в группах пациентов

| Группы больных | Генетические маркеры (DQ2, DQ8) | tTG | ДПГ | АГА | Стадия целиакии по M. Marsh |
|--|---------------------------------|-------|-------|-------|---|
| 1 – впервые выявленная целиакия (n=18) | 16/18 | 15/18 | 17/18 | 15/18 | 14/Marsh III 4/Marsh I |
| 2 – больные, соблюдающие АГД (n=45) | 39/45 | 6/45 | 7/45 | 17/45 | 6/Marsh III 13/Marsh I 25/Marsh 0 |
| 3 – группа сравнения (n=50) | 15/50 | 3/50 | 3/50 | 21/50 | 6/Marsh III 9/Marsh I 35/Marsh 0 |

Материал и методы

Обследованы следующие группы пациентов:

1. Впервые выявленная целиакия – 18 пациентов (возрастная медиана 32±25).

2. Больные целиакией, находящиеся на аглиадиновой диете (АГД) в течение года– 45 пациентов (возрастная медиана 37±23).

3. Группа сравнения – 50 пациентов (возрастная медиана 35±20).

В группу сравнения вошли пациенты, прошедшие обследование для исключения диагноза «целиакия», у которых диагноз не был подтвержден, и имеющие в анамнезе такие заболевания, как: эрозивный дуоденит, хронический гастродуоденит, хронический панкреатит, болезнь Крона, энтероколит, гипохромная железодефицитная анемия, хронический энтерит, язвенная болезнь желудка, пищевая аллергия, нейродермит. Все пациенты, помимо ДПГ, одновременно проходили обследование на тТГ (тканевые трансглутаминазные антитела), АГА (антиглиадиновые антитела), HLA-типирование с определением наследственной предрасположенности к целиакии и морфометрические маркеры в биопсийном образце СОТК.

Концентрация сывороточных маркеров определялась иммуноферментным методом, ПЦР-анализом выявлялись генетические маркеры (HLA-DQ2, HLA-DQ8) и гистологическим методом - морфометрические маркеры в биопсийном образце, полученном из дистальных отделов двенадцатиперстной кишки.

Статистическую обработку данных проводили с использованием ROC-анализа [Software MedCalc Version 11.5.1.0 <http://www.medcalc.org>] и пакета статистического анализа программы Excel 2007. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным $\leq 0,001$.

Результаты и обсуждение

Впервые выявленная целиакия (1 группа).

У трех пациентов в этой группе были зарегистрированы положительные результаты ДПГ, которые сочетались с отрицательными результатами АГА и тТГ. У одного пациента из этой группы были зарегистрированы пограничные значения ДПГ, при положительных результатах других сывороточных маркеров (таб.1). Нужно отметить, что все эти пациенты не имели выраженных изменений в слизистой тонкого кишечника (1 стадия по

классификации Marsh). Присутствие генетических маркеров наблюдалось у 16 из 18 пациентов (89%) с впервые выявленной ГЦ (1 группа) и у 39 из 45 больных (87%) второй группы, что подтверждает установленную ранее высокую предсказательную ценность отрицательного результата генетических маркеров, предполагающего отсутствие заболевания у лиц, не имеющих DQ2 и DQ8 HLA-молекул [6].

Больные целиакией, находящиеся в течение года на диете (2 группа).

У 7 из 45 пациентов, эпизодически нарушающих АГД, ДПГ были повышены, по сравнению с нормальными показателями других сывороточных маркеров, и, следовательно, могли подтвердить факт нарушения диеты, в отличие от тТГ и АГА.

У всех пациентов из этой группы IgA-тТГ не превышали установленные референтные пределы, в отличие от IgG-тТГ, которые были повышены у шести пациентов, имеющих, по результатам гистологического исследования, воспалительные процессы в СОТК. Эти данные подтвердили возможность активного участия IgG-тТГ в воспалительных процессах и в механизмах деструкции СОТК.

Что касается антиглиадиновых антител, то они были положительными у 39,5% пациентов этой группы, что указывает на недостаточную специфичность АГА (таб.1).

Группа сравнения (3 группа).

В этой группе пациентов было выявлено три положительных результата как ДПГ, так и тТГ и частое (42%) повышение АГА, которое еще раз наглядно продемонстрировало низкую специфичность этих показателей, подтвердив полученные ранее выводы о возможных ложноположительных результатах у пациентов с:

- аутоиммунной патологией (синдром Сьегрена, ревматоидный артрит, пемфигоид, пузырчатка, саркоидоз);

- постинфекционный синдром мальабсорбции, болезнь Крона, муковисцидоз, лактазная недостаточность, пищевая аллергия, атопическая экзема, нейродермит;

- при желудочно-кишечном воспалении: энтероколит, гастродуоденит, энтерит и др.

Генетические маркеры (DQ2, DQ8) в группе сравнения распределились следующим образом: у 35 пациентов (78%) отсутствовали DQ2 и DQ8, у 15 пациентов (22%) выявлена экспрессия DQ2 или DQ8 HLA-молекул, ответственных за предрасположенность к целиакии (таб.1).

Таблица 2. Диагностические показатели сывороточных маркеров

| | IgA-АГА | IgG-АГА | IgA-тТГ | IgG-тТГ | IgA-ДПГ | IgG-ДПГ |
|------------------------|------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|
| Специфичность | 89,2 | 61,4 | 97,1 | 94,6 | 93,8 | 100 |
| Чувствительность | 86,7 | 93,3 | 94,1 | 86,7 | 98,3 | 94,1 |
| Площадь под ROC-кривой | 0,935 | 0,759 | 0,996 | 0,912 | 0,995 | 0,989 |
| 95% ДИ | 0,831-0,98 | 0,621-0,867 | 0,967-0,998 | 0,80-0,972 | 0,964-0,998 | 0,954-0,999 |
| + LR | 8,02 | 1,92 | 17,27 | 16,03 | 34,53 | 35,03 |
| - LR | 0,15 | 0,13 | 0,07 | 0,14 | 0,07 | 0,065 |

Такое распределение генетических маркеров подтвердило доказанную возможность экспрессии генов, определяющих наследственную предрасположенность к целиакии, у людей, не страдающих этим заболеванием [7].

Морфометрические показатели биопсийного материала СОТК в этой группе пациентов у 6 из 50 пациентов соответствовали изменениям при деструктивной стадии целиакии по Marsh. Было отмечено, что изменения в морфометрических показателях наблюдались у больных с деструктивными (эрозивными) поражениями СОТК, такими, как: язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки, эрозивный дуоденит, язвенная болезнь желудка. В то же время значения сывороточных маркеров у этих пациентов не превышали установленные референтные пределы, отсутствовала так же наследственная предрасположенность к ЦЛ. Кроме этого, наблюдалась положительная динамика назначенного лечения, согласно выставленному диагнозу. Полученные результаты подтвердили мнение о возможности одинаковой степени выраженности морфологических изменений СОТК при других воспалительных заболеваниях тонкой кишки [4].

Примечание: числитель – количество пациентов с положительными маркерами, знаменатель – общее количество обследованных пациентов.

Изучению специфичных для целиакии антител уделяется много внимания, так как помимо диагностических характеристик, они имеют большое значение для развития целиакии, воздействуя на пролиферацию и увеличивая проницаемость кишечного эпителия, способствуя тем самым гиперплазии крипт. Специфичные антитела могут также ингибировать дифференцирование эпителиоцитов, активизировать моноциты, определяя их цитотоксичность, нарушать ангиогенез, ускорять деградацию клеточного матрикса.

Об антителах, как о диагностических тестах, стало известно в 1958 году, когда врач детской больницы Berger из города Базеля (Швейцария) впервые выявил и описал повышение антител к глиадину у больных целиакией [8].

Дальнейшее подробное изучение и понимание патогенеза целиакии привели к открытию эндомизийных (Chorzelski, 1983) и тканевых трансглутаминазных (Dieterich, 1997) антител [9,10]. Продолжающиеся исследования, проводимые для совершенствования диагностики целиакии, позволили установить структурную идентичность эндомизийных (ЕМА) и тканевых трансглутаминазных (тТГ) антител, отнести их к аутоантителам, определив их общий аутоантиген – фермент тканевую трансглутаминазу (TG2, КФ 2.3.2.13) [11].

До сих пор остается до конца непонятным, поче-

му самые специфичные антитела вырабатываются не на главный внешний триггер целиакии глютен, а на фермент TG2. В связи с этим выдвинуты две основные версии, одна из которых предполагает роль TG2 как гаптен-носителя глютенных пептидов, и молекулярная мимикрия, представляющая особый интерес как основной триггер аутоиммунной патологии, к которой относят целиакию. Молекулярную мимикрию при целиакии объясняют формированием дезаминированных пептидов глиадина, которые образуются благодаря воздействию на них TG2, осуществляющую катализ процесса дезаминирования в пептидах глютена. Итогом этого процесса является трансформация нейтральной аминокислоты глутамина в отрицательно заряженную глутаминовую кислоту, что способствует привилегированному связыванию дезаминированных пептидов глютена с молекулами HLA-DQ2, HLA-DQ8 и обеспечивает их презентацию на поверхности зрелых дендритных клеток.

Эти процессы в дальнейшем приводят к распознаванию глютенных пептидов Т-клетками, их активизации, с выработкой специфичных антител [12]. Проведенные научные исследования показали, что процесс дезаминирования глютенных пептидов, обеспечивающий помимо связывания с молекулами HLA-DQ2, HLA-DQ8, появление модифицированных эпитопов (антигенные детерминанты), похожих по своей структуре на эпитопы TG2, смог объяснить молекулярную мимикрию и выработку тТГ-зависимых антител к дезаминированным пептидам глютена [13].

В отличие от дезаминированных пептидов глютена, которые принимают активное участие в патогенезе целиакии, глиадиновые пептиды распознаются и связываются антиглиадиновыми антителами как ответная реакция на антиген, не отражающая характерные изменения в слизистой тонкого кишечника. Полученные результаты наших исследований подтвердили высокую специфичность у ДПГ и недостаточную – у АГА, особенно у IgG-АГА. Однако, высокая чувствительность IgG-АГА позволяет их использовать при селективном IgA-дефиците у больных целиакией (таб.2).

Анализ полученных результатов выявил самую высокую чувствительность у ДПГ, которая помогает выявлять целиакию при невыраженных патогистологических изменениях в СОТК, что подтверждено полученными результатами проведенного исследования (таб.2).

Показатели площади под ROC-кривой, отношение правдоподобия отрицательного и положительного результатов, величина достоверного интервала оказались лучшими у IgG-ДПГ, IgA-тТГ, IgA-ДПГ-тестов. Самые

Таблица 3. Диагностические показатели комбинированных тестов

| | IgA-ДПГ+ IgA-тТГ | IgA-тТГ+ IgG-ДПГ | IgA-тТГ+ IgA- ДПГ+IgG-ДПГ |
|------------------|---------------------|---------------------|------------------------------|
| Специфичность | 92.5 | 97.5 | 96.3 |
| Чувствительность | 100 | 100 | 100 |
| 95% ДИ | 84.6-97.2 | 91.3-99.6 | 89.5-99.2 |
| + LR | 13.5 | 27.0 | 40.0 |
| - LR | 0 | 0 | 0 |

большие значения площади под ROC-кривой, подтверждающие информативность теста. Были получены у ДПГ-теста (рис.1 - смотрите на цветной вкладке журнала).

Попытка использования разных комбинаций этих тестов с учетом их специфичности и чувствительности дала следующие результаты (табл.3):

С учетом полученных лабораторных характеристик, наиболее оптимальной комбинацией является совместное использование IgA-тТГ+ IgG-ДПГ или IgA-тТГ+ IgA-ДПГ+IgG-ДПГ.

Обращает внимание 100% чувствительность, полученная во всех трех комбинациях с использованием двух маркеров (ДПГ и тТГ). Такая чувствительность подчеркивает зависимость сывороточных маркеров от степени поражения СОТК и может обеспечивать:

- выявление ранних и атипичных форм целиакии, протекающих без выраженных изменений в СОТК;
- диагностику нарушений при соблюдении безглютеновой диеты;
- большую достоверность полученных результатов в отличие от морфометрических маркеров в биопсийном образце СОТК при выявлении ранних и атипичных форм

целиакии, с возможностью их замены на ДПГ.

Выводы.

1. Высокие чувствительность и специфичность ДПГ позволяют рекомендовать эти маркеры для выявления разных форм целиакии
2. ДПГ, как наиболее информативный диагностический тест, может успешно заменить АГА, как в диагностике целиакии, так и для проведения контроля за соблюдением диеты.
3. Совместное использование антител к ДПГ и тТГ является наиболее диагностически значимым и оптимальным совокупным тестом для диагностики целиакии.■

Вохмянина Н.В., кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией ГУЗ «Диагностический центр (медико-генетический)»; Автора, ответственный за переписку - Вохмянина Наталья Васильевна, 194044, Санкт-Петербург, ул.Тобольская д.5, телефон: 8-812-294-70-03, факс: 8-812-294-70-01, моб.:8-921-58-98-356, e-mail: spbna1@yandex.ru.

Литература:

1. Troncone, R. Review article: future research on coeliac disease - a position report from the European multistakeholder platform on coeliac disease (CDEUSSA) / R.Troncone, A.Ivarsson, H.Szajewska, M.L.Mearin// Alimentary Pharmacology & Therapeutics. - 2008. - Vol. 27 - P.1030-1043.
2. Lorenz, R.G. Celiac disease/R.G. Lorenz// Clin. Laboratory News. -2007. -Vol.33, -№ 8. -P.10-15
3. Utility in clinical practice of immunoglobulin a anti-tissue transglutaminase antibody for the diagnosis of celiac disease /J.A. Abrams [at al.]/Clin.Gastroenterol.Hepatol. -2006. -Vol.4, № 6. -P.726-730
4. Говорун Ю.В. Диагностика и лечение целиакии: учебно-методическое пособие/Ю.В. Говорун, А.С. Портянко, Ю.Х. Мараховский. - Минск - 2006. -31с
5. Sugai, E.Celiac disease serology in patients with different pretest probabilities: Is biopsy avoidable? / E.Sugai, M.L. Moreno, H.J.Hwang [at al.]/World J Gastroenterol. -2010 July 7. - Vol. 16(25). -P.3144-3152.
6. Вохмянина, Н.В. Значение серологической диагностики для определения отсутствия толерантности к проламинам определенных сортов овса у больных целиакией. / Н.В. Вохмянина, В.Л. Эмануэль, И.П. Гаврилюк, В.Н. Красильников, Н.В. Алпатова // «Клиническая лабораторная диагностика», - № 4. - 2007. - С.32-35.
7. Вохмянина, Н.В. Опыт HLA-типирования у больных целиакией. Диагностическая значимость HLA-DQ2 и HLA-DQ8. / Н.В. Вохмянина // «Медицинская генетика», - № 7. - 2010. -С.33-40.
8. Zur allergischen Pathogenese der Coliakia Bibliotheca Paediatrica - 1958. - Vol.67. - P.1-55.
9. Chorzelski, T.P. IgA class endomysium antibodies in dermatitis herpetiformis and coeliac disease / T.P. Chorzelski, T. Sulej, H. Tchorzenwska [et al.] // Ann NY Acad Sci. -1983. - Vol.420. -P.325-34.
10. Dieterich, W. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease / W. Dieterich, T. Ehnis, M. Bauer [et al.] // Nat Med. -1997. - Vol.3. -P.797-801.
11. Korponay-Szabo, I.R./ Antibody testing in celiac disease /I.R. Korponay-Szabo // International Celiac Disease Meeting - Maribor, 13-16 September. - 2007. -P.71-83
12. Richard, J.F. Celiac spru / J.F. Richard, P.K. Claran // EnglJ.Med. -2002. - Vol.346. -P.180-188.
13. Korponay-Szabo, I.R. Deamidated Gliadin Peptides Form Epitopes That Transglutaminase / I.R. Korponay-Szabo // J Pediatr Gastroenterol Nutr. - 2008. - Mar.; - Vol.46 (3). - P.253-261.

Пьер Карстен Тfelt-Хансен
 Головные боли в практике врача приемного покоя и врача скорой помощи

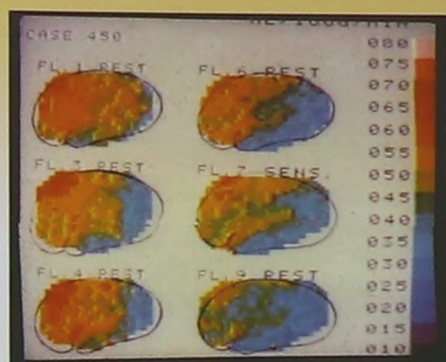


Рис. 1. Распространяющаяся олигемия во время мигренозной ауры [Olesen et al 1981]

Вохмянина Н.В.
 Дезаминированные пептиды глинадина. Оптимальный подход к диагностике целиакии

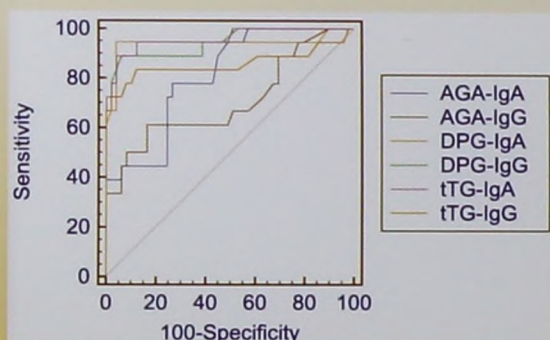


Рис.1. Сравнительная характеристика значений площади под ROC-кривой, полученных при определении AGA, tTG, DPG

Бакиров С.Х., Сакаев Р.Ш.
 Использование плазменных технологий при хирургическом лечении желчнокаменной болезни

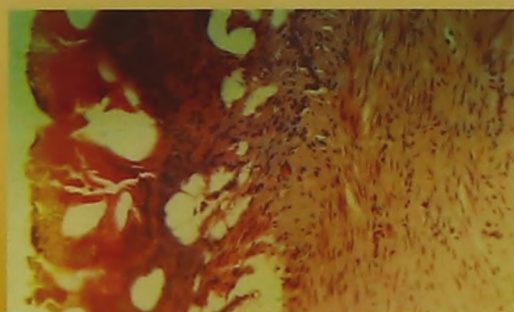


Рис.1 Зона струпа, зона уплотнения и прижигающая полоса рыхлой соединительной ткани части слизистой оболочки желчного пузыря при применении СУПР-М. Окраска гематоксилин-эозин. Микрофото. Ок-10.06.-40.

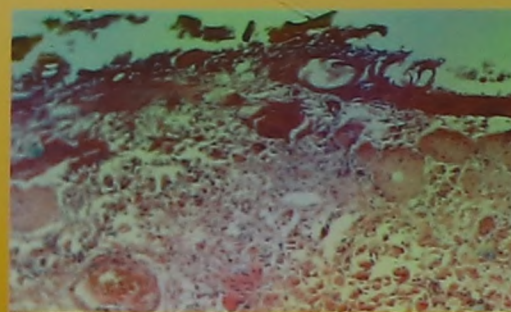


Рис.2. Слизистая оболочка фрагмента желчного пузыря после термического воздействия СУПР-М. Окраска гематоксилин-эозин. Микрофото. Ок-10.06.-20