

Субэпителиальные депозиты IgA-tTG в слизистой тонкого кишечника – перспективные лабораторные маркеры глютеновой энтеропатии

Вохмянина Н. В. – к.м. н., заведующая лабораторией ГУЗ «Диагностический центр (медико-генетический)», г. Санкт-Петербург; **Козлов А. В.** – д. м. н., профессор, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики Санкт-Петербургской медицинской академии последипломного образования (СПбМАПО), г. Санкт-Петербург; **Орешко Л. С.** – д. м. н., профессор кафедры пропедевтики внутренних болезней с курсом нутрициологии и клинического питания Санкт-Петербургской государственной медицинской академии им. Мечникова И.И. (СПбГМА), г. Санкт-Петербург

Clinical study a Small-bowel mucosal transglutaminase 2-specific IgA deposits for the Diagnostics and efficiency in treatment of Celiac disease - results and conclusion

Vokhmyanina N.V., Kozlov A.B., Oreshko L.S.

Резюме

Представлены исследования по определению субэпителиальных депозитов тканевых трансглутаминазных антител (IgA-tTG) в биоптатах слизистой оболочки тонкого кишечника у пациентов в разных группах: впервые выявленная целиакия (18), больные целиакией, находящиеся на лечении (18) и пациенты без целиакии (40). Все пациенты, одновременно с субэпителиальными депозитами тканевых трансглутаминазных антител, прошли обследование на сывороточные, генетические и гистологические маркеры. Использование данного метода показало высокую диагностическую эффективность выявления субэпителиальных депозитов тканевых трансглутаминазных антител IgA-tTG для диагностики целиакии и мониторинга патогенетической диетотерапии.

Ключевые слова: целиакия, депозиты тканевых трансглутаминазных антител слизистой тонкого кишечника, эффективность диагностики и лечения

Summary

In this study is investigated transglutaminase-2 specific mucosal IgA autoantibody deposits which determined from small-bowel mucosal biopsies in 18 untreated, 18 treated celiac disease patients and in 40 nonceliac controls. The presence of the deposits was compared with mucosal villous morphology celiac, serology and genetic markers. The analysis of results has shown high diagnostic efficiency of discovering subepithelial deposits mucosal transglutaminase-2 specific IgA autoantibody in the diagnostics and dietary monitoring of this disorder

Key words: celiac disease, mucosal autoantibody deposits, effective diagnostics and treatment

Введение

Целиакия – генетически детерминированная, аутоиммунная энтеропатия, связанная с развитием синдрома мальабсорбции и постепенным вовлечением в патологический процесс многих органов и систем.

Основным внешним триггером целиакии является глютен (растительный белок пшеничной клейковины), который у больных целиакией вызывает формирование патологического иммунного ответа. Иммуногенность глютена проявляется после воздействия на него фермента тканевой трансглутаминазы (TG2, КФ 2.3.2.13), трансформирующей в пептидах глютена нейтральные остатки глутамина в отрицательно заряженную глутаминовую кислоту (реакции дезаминирования), а также приводящей к образованию изопептидных связей между пептидами глютена или между глютенем и TG2 (реакции перекрестного сшивания белков)[1]. Перечисленные процессы определяют активацию Т- и В-лимфоцитов, итогом которой становится увеличенная продукция провоспалительных цитокинов, приводящая к атрофии слизистой

Ответственный за ведение переписки -
Вохмянина Наталья Васильевна,
194044, Санкт-Петербург, ул.Тобольская д.5,
тел.: 8-812-294-70-03,
факс: 8-812-294-70-01,
моб.:8-921-58-98-356,
e-mail: spbnat@yandex.ru

оболочки тонкого кишечника (СОТК) и продукция эндомизийных (ЕМА) и тканевых транслугтаминазных (tTG) аутоантител, выявление которых в сыворотке крови широко используется для диагностики целиакии [6]. Проводимое подробно изучение сывороточных маркеров определило зависимость антител от степени поражения слизистой оболочки тонкого кишечника, что объяснило возможность сопровождения целиакии с атипичным течением (например, латентная форма) и раннего ее выявления отрицательными результатами сывороточных маркеров [10]. Необходимость своевременной диагностики целиакии обозначило поиск новых лабораторных показателей.

Как показали научные исследования, выработка аутоантител начинается в собственной пластинке слизистой оболочки тонкого кишечника (*lamina propria*), куда проникают пептиды глютена, не подвергаясь кишечному протеолизу (протективный ретротранзитоз). Изучение этих антител (Korponay-Szabo, I.R., 2004) выявило возможность субэпителиального IgA-tTG депонирования в СОТК еще до развития в ней гистологических изменений, характерных для целиакии [4]. Кроме этого, IgA-tTG депозиты, по результатам зарубежных исследований, продемонстрировали более высокую диагностическую эффективность для ранних и атипичных форм целиакии, чем морфометрические показатели, считавшиеся до недавнего времени «золотым» диагностическим стандартом [2]. Установленные диагностические преимущества IgA-tTG депозитов в биопсийных образцах СОТК в настоящее время успешно используются для диагностики целиакии в странах Европы [3]. В России до сих пор IgA-tTG депозиты не изучались и не применяются в целях выявления целиакии.

Цель работы: провести определение IgA-tTG субэпителиальных депозитов в биопсийных образцах СОТК. Показать диагностическую эффективность выявления IgA-tTG депозитов у больных целиакией.

Материалы и методы

Из пациентов (81), с возрастной медианой 40±25 лет, прошедших обследование по поводу подозрения на целиакию, были сформированы следующие группы:

- 1 Группа. Впервые выявленная целиакия (18 пациентов)
- 2 Группа. Больные, с установленным диагнозом «целиакия», находящиеся на безглютеновой диете (18 пациентов)
- 3 Группа. Пациенты, с подозрением на целиакию, у которых диагноз «целиакия» не подтвердился - 40 пациентов

(группа сравнения).

Определение IgA-tTG депозитов в биоптатах СОТК проводили иммуноферментным методом после предварительной элюции субэпителиальных IgA-tTG комплексов из биопсийных образцов раствором монохлоруксусной кислоты 2.5 г/л (pH=3,1), с последующим доведением pH элюата до 6,8-7,0 0,05 моль/л трис-HCl буфером. Концентрацию IgA-tTG депозитов в СОТК выражали в единицах оптической плотности – оптические единицы (О.Е.).

В сыворотке крови иммуноферментным методом определяли антиглиадиновые (AGA), тканевые транслугтаминазные (tTG) антитела, методом непрямой флуоресценции - эндомизийные антитела (ЕМА), ПЦР-анализом - генетические маркеры (HLA-DQ2, HLA-DQ8) и гистологическим методом - морфометрические маркеры в биопсийном образце. Стадию целиакии оценивали по критериям, предложенным М. Marsh [7].

Обработка данных проводилась с использованием пакета статистического анализа программы Excel 2007. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался $\leq 0,001$.

Результаты и обсуждение

Результаты проведенного исследования представлены в таблице №1

Анализ полученных результатов привел к необходимости дифференцированного подхода для получения статистически значимых отклонений. В связи с этим проведено разделение пациентов на подгруппы в группах 1 и 2 (рис.1).

При обследовании пациентов (таб.№1, рис.1) были получены следующие результаты.

Группа сравнения (3 группа). Из 40 пациентов данной группы, у 34 пациентов (85%) низкие значения оптической плотности IgA-tTG депозитов сопровождалось отрицательными значениями сывороточных и гистологических маркеров. У шести пациентов из этой группы, имеющих в анамнезе аутоиммунные заболевания (неспецифический язвенный колит - I, болезнь Крона - I, аллергическая энтеропатия -I, инсулинозависимый сахарный диабет-I, аутоиммунный тиреоидит-I, псевдотуберкулез-I), были зарегистрированы повышенные значения оптической плотности IgA-tTG депозитов (в среднем до 0,25 О. Е.). У этих пациентов с деструктивной стадией по М.Marsh определялись отрицательные результаты сывороточных и генетических маркеров.

Генетические маркеры (DQ2, DQ8) в группе сравнения распределились следующим образом: у 32 пациентов (80%)

Таблица 1. Характеристики лабораторных показателей в группах пациентов

Группы пациентов	Генетические маркеры (DQ2,DQ8)	AGA, tTG, ЕМА	Стадия целиакии по М. Marsh	IgA-tTG депозиты (О.Е.)
1.Впервые выявленная целиакия (n=18), из них:	16/2	15/3	15/Marsh III 3/Marsh 0	17/1
2.Безглютеновая диета (n=18):	14/4	4/14	6/Marsh III 2/Marsh I 10/Marsh 0	18/0
3.Группа сравнения (n=40)	8/32	0/0	12/Marsh III 8/Marsh I 20/Marsh 0	6/34

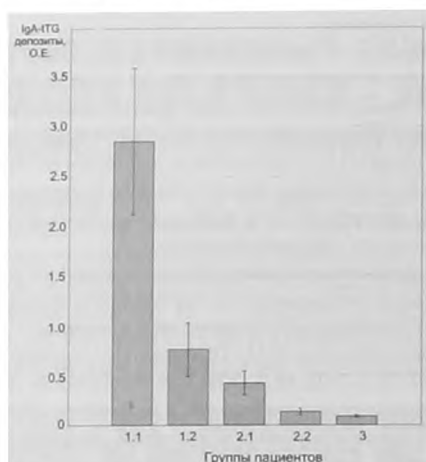


Рис.1. Средние значения и доверительный интервал ($p < 0,001$) оптической плотности IgA-tTG депозитов в разных группах пациентов.

1. Впервые выявленная целиакия: 1.1 – пациенты с классической целиакией, 1.2 – пациенты с атипичным течением целиакии. 2. Безглютеновая диета: 2.1 – пациенты, соблюдающие строгую диету до трех месяцев и пациенты, эпизодически нарушающие диету; 2.2 – пациенты, соблюдающие строгую диету от года до двух лет

отсутствовали DQ2 и DQ8, у 8 пациентов (20%) была выявлена экспрессия DQ2 или DQ8 молекул, ответственных за предрасположенность к целиакии. Распределение генетических маркеров целиакии в группе сравнения подтвердило полученные ранее результаты зарубежных авторов и вывод о возможности экспрессии генов, определяющих предрасположенность к целиакии, у не страдающих этим заболеванием индивидуумов [5].

Анализ результатов больных с установленным диагнозом «целиакия» (2 группа), показал, что у пациентов, соблюдавших безглютеновую диету от года до двух, средняя оптическая плотность IgA-tTG депозитов составляла 0,134 О.Е., с разбросом показателей от 0,12 до 0,17 О.Е., при этом гистологические и сывороточные маркеры соответствовали нормальным значениям. Пациенты, имеющие небольшую длительность строгой безглютеновой диетотерапии (до трех месяцев), или эпизодически ее нарушающие, оптическая плотность IgA-tTG депозитов была значительно выше (в среднем 0,421 О.Е., с колебаниями от 0,32 до 0,60 О.Е.).

Гистоморфометрические показатели в этой подгруппе 2.1 характеризовали деструктивную стадию целиакии на фоне как повышенных, так и нормальных значений сывороточных маркеров. Нужно отметить, что при сравнении результатов, полученных по сывороточным маркерам и IgA-tTG депозитам в подгруппе 2.2, у пациентов, соблюдающих диету от года до двух, концентрация сывороточных маркеров приходила в норму значительно быстрее, чем значения IgA-tTG депозитов.

Впервые выявленная целиакия (1 группа). В группе пациентов с впервые выявленной целиакией у 95% пациентов зарегистрированные значения оптической плотности IgA-

tTG депозитов были как очень высокими (среднее значение 2,86 О.Е.), так и умеренно повышенными (среднее значение 0,759 О.Е.), при сравнимых по выраженности результатах гистологических маркеров, характеризовавших деструктивную стадию болезни по M.Marsh. Очень высокие значения IgA-tTG депозитов были получены у пациентов с классической формой целиакии (подгруппа 1.1 с преобладанием диареи), которая была выявлена только у трех из 18 пациентов. В этой же подгруппе 1.1 было зарегистрировано два пациента с бессимптомной формой целиакии. Оба пациента не предъявляли жалоб и были обследованы в связи с выявлением случаев целиакии в семье. У одного пациента IgA-tTG депозиты были высокими (2,26 О.Е.), у другого – отрицательными (0,052 О.Е.) на фоне остальных положительных лабораторных маркеров целиакии.

Заслуживают внимания результаты обследования у пациента из подгруппы 1.2, у которого умеренно повышенные IgA-tTG депозиты (0,629 О.Е.) сочетались с нормальными значениями сывороточных и гистологических маркеров. Дальнейшее наблюдение за этим пациентом, позволило выставить клинический диагноз «целиакия» с последующим переводом на безглютеновую диету. Нужно отметить также, что в этой же подгруппе 1.2 у одного из двух пациентов был зарегистрирован отрицательный результат сывороточных маркеров на фоне высокой оптической плотности IgA-tTG депозитов, у другого – умеренно повышенные значения IgA-tTG депозитов на фоне отрицательных морфометрических маркеров. Этим пациентам в дальнейшем был выставлен диагноз «целиакия».

По полученным результатам были установлены специфичность и чувствительность метода определения IgA-tTG депозитов в биопсийных образцах, которые составили 83% и 92% соответственно.

В развитии целиакии большое значение отводится пептидам глютена, который играет фундаментальную роль в питании человека, составляя почти треть потребляемого белка. Пептиды глютена, в отличие от здоровых пациентов, у больных целиакией проникают в собственную пластинку слизистой тонкого кишечника (*lamina propria*), не подвергаясь кишечному протеолизу, провоцируя формирование патологического иммунного ответа. Сравнительно недавно этот факт получил объяснение в имеющей место у больных целиакией протективной форме транспорта, которая защищает пептиды глютена от ферментного воздействия и обеспечивает проникновение необработанных пептидов в *lamina propria* (T.Matysiak-Budnik et al, 2008). Увеличенная у больных целиакией экспрессия CD71 (рецептор трансферрина) на апикальной поверхности эпителиоцитов и его высокая аффинность связывания с секреторным и димерным иммуноглобулином A (*dIgA/sIgA*), обеспечивают доставку необработанных пептидов глютена через базальную мембрану кишечного эпителия в *lamina propria* [9]. Протективный транспорт необработанных пептидов глютена, помимо формирования патологического иммунного ответа, смог объяснить субэпителиальное депонирование IgA в слизистой тонкой кишки и выявить его строгую специфичность к TG2, которая была объяснена ковалентным связыванием тканевой транслугуминазой пептидов глютена и присутствием TG2

в образовавшихся комплексах [8]. Проведенные исследования также показали, что у больных целиакией, находящихся на безглютеновой диете сохраняется остаточная экспрессия CD71, которая способствует проникновению небольшого количества пептидов глютена в lamina propria, поддерживающих не активные воспалительные процессы в СOTK, что может являться причиной рецидива, особенно при нарушении лечения. Полученные выводы из цитируемой работы зарубежных авторов подтверждены результатами нашего исследования, которые показали, что эпизодическое нарушение диеты не выявляется сывороточными и морфометрическими показателями. В этом случае только IgA-tTG депозиты были умеренно повышенными и помогли обратить внимание на все еще имеющееся неблагополучие в СOTK, которое, как установлено, поддерживалось остаточной экспрессией CD71. Кроме того, было замечено, что сывороточные маркеры у больных целиакией, находящихся на безглютеновой диете, намного быстрее приходили в норму и не отражали динамику процессов восстановления в слизистой, в отличие от IgA- tTG депозитов. Так, пациенты, находящиеся до двух лет на строгой безглютеновой диете, так и не достигли значений IgA- tTG депозитов в группе сравнения (0,134 О.Е. против 0,088 О.Е. соответственно), в то время как сывороточные маркеры приходили в норму через 2-3 месяца.

Полученные результаты обследования пациентов, из группы с впервые выявленной целиакией (группа 1), у которых были зарегистрированы высокие и умеренно повышенные значения IgA- tTG депозитов при отрицательных результатах как сывороточных, так и морфометрических маркеров, с выставленным в дальнейшем диагнозом «целиакия», подтвердили раннее депонирование IgA- tTG-комплексов с возможностью их выявления и своевременного диагностирования целиакии, продемонстрировав высокую специфичность и чувствительность.

В этой же группе 1 разные уровни IgA- tTG депозитов отражали разное клиническое течение болезни при относительно одинаковой выраженности морфометрических пока-

зателей. Так, было замечено, что у пациентов с атипичным течением целиакии отмечались умеренно повышенные значения показателей IgA - tTG депозитов, в отличие от пациентов с классической целиакией, для которых характерными были высокие значения оптической плотности IgA - tTG депозитов.

Что касается повышенных значений IgA-TG2 депозитов у больных без целиакии, но имеющих в анамнезе аутоиммунные заболевания, то полученные результаты можно объяснить тем, что при аутоиммунной патологии появляется репертуар незрелых В-клеток, который образуется за счет перераспределения сегментов вариабельных генов антител (V-генов). Гипермутации в V-генах при аутоиммунной патологии приводят к повышению аффинности определенных клонов антител и активному связыванию с антигеном. Проведенные исследования, на примере инсулинозависимого сахарного диабета, показали, что у пациентов появляются антитела VH1 и VH4 семейства генов, которые тоже способны связываться с TG2 (при целиакии присутствуют антитела VH5-семейства генов) [3].

Приведенные выводы зарубежного исследования помогают понять и объяснить появление ложно-положительных значений IgA-TG2 депозитов при аутоиммунной патологии.

Выводы

Проведенное исследование подтвердило возможность ранней диагностики целиакии при выявлении IgA-TG2 депозитов в слизистой тонкого кишечника.

Установленные высокая специфичность и чувствительность метода определения IgA -TG2 депозитов в слизистой тонкого кишечника, позволяют рекомендовать данный метод для диагностики разных форм целиакии и мониторинга диетотерапии.

Во избежание неправильной постановки диагноза «целиакия» необходимо использовать комплекс лабораторных маркеров, включающих определение сывороточных, морфометрических, генетических маркеров, с обязательным учетом результатов определения IgA -TG2 в СOTK. ■

Литература:

1. Auricchio, R. Diagnosis of celiac disease / R. Auricchio, R. Troncone // *Pediatr. Adolesc. Med. Basel.* – 2008. – Vol. 12. – P. 107–113.
2. Celiac disease – from inflammatory to atrophy: a long term follow up study / M.L. Lahdeaho [et al.] // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* – 2005. – Vol. 41. – P. 44–48.
3. Immunoglobulin A Anti-tissue Transglutaminase Antibody Deposits in the Small Intestinal Mucosa of Children With No Villous Atrophy / Tosco, Antonella [et al.] *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*: September 2008 – Vol. 47 – P. 293–298
4. In vivo targeting of intestinal and extraintestinal transglutaminase 2 by celiac autoantibodies / I.R. Korponay-Szabo [et al.] // *Gut.* – 2004. – Vol. 53. – P. 641–648.
5. Isolation and culture of fibroblasts from endoscopic duodenal biopsies of celiac patients / Leda Roncoroni [et al.] *Journal of Translational Medicine* 2009, 7:40
6. Lorand, L. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions / L. Lorand, R. Graham // *Nature Publishing Group.* – 2003. – Vol. 4. – P. 140–156.
7. Marsh, M.N. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine: a molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity («celiac sprue») / M.N. Marsh // *Gastroenterol.* – 1992. – Vol. 102. – P. 330–354.
8. Molecular characterization of covalent complexes between tissue transglutaminase and gliadin peptides / B. Fleckenstein [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279, u 17. – P. 17607–17616.
9. Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferring receptor in celiac disease / Tamara Matysiak-Budnik [et al.] // *JEM* – 2008. – Vol. 205. u1. – P. 143–154
10. Utility in clinical practice of immunoglobulin a anti-tissue transglutaminase antibody for the diagnosis of celiac disease / J.A. Abrams [et al.] // *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* – 2006. – Vol. 4, u 6. – P. 726–730.