

Литература

1. Национальные клинические рекомендации. Торакальная хирургия / П.К. Яблонский [и др.] – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. 160 с.

National clinical guidelines. Thoracic surgery / P.K. Iyablonskiy [et al]. Moscow : GEOTAR-Media, 2014:160.

2. Клинические рекомендации по хирургическому лечению больных послеоперационным медиастинитом и остеомиелитом грудины и ребер: методич. рекомендации для врачей / В.А. Порханов, А.А. Печетов, В.А. Митиш [и др]. Краснодар - Москва, 2014. – 25с.

Clinical recommendations for surgical treatment of patients with postoperative mediastinitis and osteomyelitis of the sternum and ribs: Methodological recommendations for doctors / V.A. Porhanov, A.A. Pechetov, V.A. Mitish [et al.]. Krasnodar - Moscow, 2014. – 25 p.

3. Al-Ebrahim K, Al-Ebrahim E Prevention, Classification and Management Review of Deep Sternal Wound Infection Heart. The Heart Surgery Forum. 2020 Sep;14;23(5):E652-E657. doi: 10.1532/hsf.3153.

4. Colombier S, Kessler U, Ferrari E, von Segesser LK, Berdajs DA. Influence of deep sternal wound infection on long-term survival after cardiac surgery. Medical Science Monitor. 2013 Aug;14;19:668-73. doi: 10.12659/MSM.889191.

5. Gatti G, Benussi B, Brunetti D, Ceschia A,

Porcari A, Biondi F, Castaldi G, Luzzati R, Sinagra G, Pappalardo A. The fate of patients having deep sternal infection after bilateral internal thoracic artery grafting in the negative pressure wound therapy era. International Journal of Cardiology. 2018 Oct;15;269:67-74. doi: 10.1016/j.ijcard.2018.07.090.

6. Hawkins RB, Mehaffey JH, Charles EJ, Krebs ED, Smith JG, Kern JA, Wanchek T, Teman NR. Cost-Effectiveness of Negative Pressure Incision Management System in Cardiac Surgery. J Surg Res. 2019 Aug;240:227-235. doi: 10.1016/j.jss.2019.02.046. Epub 2019 Apr 15.

7. Hernandez R, Lehr E.J. Mortality following deep sternal wound infection-not just a short-term complication? Eur J Cardiothorac Surg. 2021 Apr;11;ezab156. doi: 10.1093/ejcts/ezab156. Online ahead of print.

8. Lazar HL, Salm TV, Engelman R, Orgill D, Gordon S. Prevention and management of sternal wound infections. Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. 2016 Oct;152(4):962-72. doi: 10.1016/j.jtcvs.2016.01.060.

9. Lee G.S., Bisleri G, Tam D.Y. Deep Sternal Wound Infections: One Bad Cut, a Lifetime of Trouble Ann Thorac Surg. 2023 Jan;115(1):280-281. doi: 10.1016/j.athoracsur.2022.05.044. Epub 2022 Jun 11.

10. Kirmani BH, Jones SG, Datta S, McLaughlin EK, Hoschitzky AJ. A meta-analysis of platelet gel for prevention of sternal wound infections following cardiac surgery. Blood Transfus. 2017

Jan;15(1):57-65. doi: 10.2450/2016.0231-15. Epub 2016 Apr 28.

11. Pradeep A, Rangasamy J, Varma PK, Recent developments in controlling sternal wound infection after cardiac surgery and measures to enhance sternal healing. Medicinal Research Reviews. 2021 Mar;41(2):709-724. doi: 10.1002/med.21758.

12. Schwann TA, Gaudino MFL, Engelman DT, Sedrakyan A, Li D, Tranbaugh RF, Habib RH. Effect of Skeletonization of Bilateral Internal Thoracic Arteries on Deep Sternal Wound Infections. The Annals of Thoracic Surgery. 2021 Feb;111(2):600-606. doi: 10.1016/j.athoracsur.2020.05.044.

13. Vestergaard RF, Bruel A, Thomsen JS, Bruel A, Hauge EM, Sobale K, Hasenkam JM. The influence of hemostatic agents on bone healing after sternotomy in a porcine model. The Annals of Thoracic Surgery. 2015 (99):1005-1011.

14. Vogt PR, Berdat PA, Santoro G, Schmidlin D, Khubulava GG, Marchenko S, Andreas M, Laufer G, Tabori E, Darrel A. Significant Reduction of Sternal Wound infection in Cardiac Surgical Patients. American Journal of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 2019 2(2):1035

15. Zhou P, Zhu P, Nie Z, Zheng S. Is the era of bilateral internal thoracic artery grafting coming for diabetic patients? An updated meta-analysis. Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. 2019 Dec;158(6):1559-1570. doi: 10.1016/j.jtcvs.2019.01.129.

Ю.Р. Ахвердян, Е.В. Папичев, Б.В. Заводовский,
Ю.В. Полякова, Л.Е. Сивордова

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИНУКЛЕАРНЫХ АНТИТЕЛ МЕТОДОМ ИММУНОБЛОТТИНГА ДЛЯ УТОЧНЕНИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПАЦИЕНТОВ С СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ И СИНДРОМОМ ШЕГРЕНА

DOI 10.25789/YMJ.2024.85.09

УДК 616.72

Целью исследования было изучение иммунологической характеристики пациентов с системной красной волчанкой (СКВ) и синдромом Шегрена (СШ) путем определения антинуклеарных антител методом иммуноблоттинга. В группах пациентов с СКВ и СШ достоверно чаще наблюдались анти-SS-A native, антитела к гистонам достоверно чаще выявлялись в группе пациентов с СКВ. Наиболее специфичными тестами для диагностики СКВ являются антитела к антигенам RNP/Sm, SS-A native, антитела к гистонам, для СШ - анти-SS-A native, анти-Ro-52 recombinant, анти-RIB. С помощью дополнительных методов статистического анализа подтверждены рассчитанные чувствительность и специфичность определения анти-SS-A native для диагностики СКВ и анти-Ro-52 – для СШ.

Ключевые слова: системная красная волчанка, синдром Шегрена, иммуноблоттинг, антинуклеарные антитела.

НИИ клинич. и эксперимент. ревматологии им. А.Б. Зборовского: **АХВЕРДЯН Юрий Рубенович** – к.м.н., с.н.с., doctor_2001@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8010-6777>, **ПАПИЧЕВ Евгений Васильевич** – к.м.н., н.с., <https://orcid.org/0000-0002-8799-2991>, **ЗАВОДОВСКИЙ Борис Валерьевич** – д.м.н., зам. директора, зав. лаб., <https://orcid.org/0000-0002-8864-9570>, **ПОЛЯКОВА Юлия Васильевна** – к.м.н., н.с., <https://orcid.org/0000-0002-3022-4166>, **СИВОРДОВА Лариса Евгеньевна** – к.м.н., в.н.с., <https://orcid.org/0000-0002-0965-6060>.

The aim of the study was to study the immunological characteristics of patients with systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome by determining antinuclear antibodies using immunoblotting. In the groups of patients with SLE and SS, anti-SS-A native was observed significantly more often. Antibodies to histones were significantly more often detected in the group of patients with SLE. The most specific tests for diagnosing SLE are antibodies to the antigens RNP/Sm, SS-A native, antibodies to histones, for SS - anti-SS-A native, anti-Ro-52 recombinant, anti-RIB. Using additional methods of statistical analysis, the calculated sensitivity and specificity of anti-SS-A native for diagnosing SLE and anti-Ro-52 for SS were confirmed.

Keywords: systemic lupus erythematosus, Sjögren's syndrome, immunoblotting, antinuclear antibodies.

Введение. Ревматические заболевания являются огромным социально-экономическим бременем и, по рекомендации ВОЗ, изучение их распространенности, заболеваемости, смертности и профилактики должно быть составной частью национальных программ сохранения здоровья населения и основой планирования медицинской помощи [1]. Патогенез ревматических заболеваний основан на взаимодействии средовых и генетических факторов. Наиболее изученными генетическими факторами являются человеческие лейкоцитарные антигены (HLA), специфические гаплотипы которых достоверно ассоциируются с конкретным диагнозом. Так, гаплотипы HLA-DRB1*03:01 и *15:01 являются генетическими факторами риска системной красной волчанки (СКВ) в европейской популяции, а RTRN22 встречается не только при СКВ, но и при других ревматических заболеваниях, в частности при ревматоидном артрите (РА) [8]. Системные ревматические заболевания имеют гетерогенный клинический фенотип, что затрудняет их клиническую диагностику и требует активного использования лабораторных и инструментальных методов исследования. Эксперты подчеркивают необходимость ранней диагностики СКВ, но недавние исследования подтверждают, что пациенты с СКВ по-прежнему сталкиваются с поздней диагностикой заболевания (в среднем 2 года от появления симптомов) [4].

Преимуществами лабораторных методов исследования являются объективность получаемых данных о характере иммунопатологического процесса и аутоиммунных заболеваниях, возможность их использования для диагностики, оценки активности болезни, определения прогноза, выявления поражения отдельных органов, выбора метода лечения и мониторинга эффективности проводимой терапии [2, 9].

Основой диагностики нозологического диагноза системных ревматических заболеваний являются иммунологические исследования. Иммунофлюоресцентное определение антинуклеарных антител (АНА) – это стандарт лабораторного обследования больных с системными ревматическими заболеваниями. АНА это класс антител, которые связываются с клеточными компонентами в ядрах, ДНК, РНК и комплексами нуклеиновых кислот с белками [9]. Традиционными методами исследования АНА являются скрининговые методы, оценивающие наличие АНА в сыворотке

крови, без уточнения специфики (метод непрямой иммунофлюоресценции на срезах тканей крыс или мышей). В последние годы появились новые методы, позволяющие определить тип АНА, имеющийся у пациента. К ним относят метод ИФА, используемый для определения большого количества аутоантител, требующий одномоментного применения нескольких тест-систем (до 20) [1, 5].

Одним из наиболее распространенных методов является определение всего профиля АНА одномоментно с помощью иммуноблоттинга. Этот метод позволяет выявлять антитела к аутоантигенам: Sm, RNP/Sm, SS-A(60 кДа), SS-A(52 кДа), SS-B, Scl-70, PM-Scl, PCNA, CENT-B, dsDNA/Histone/Nucleosome, RibP, AMA-M2 и Jo-1. Считается, что метод можно использовать для скрининга АНА [10], однако ценность данного метода изучена недостаточно и требует уточнения.

Цель исследования: изучить иммунологическую характеристику пациентов с системной красной волчанкой и синдромом Шегрена путем определения антинуклеарных антител методом иммуноблоттинга.

Материалы и методы. Исследование проводилось на базе ФГБНУ «НИИ клинической и экспериментальной ревматологии им. А.Б. Зборовского», г. Волгоград. Под нашим наблюдением находилось 69 пациентов, средний

возраст которых составил 38,9 года [23,2-62,9], из них 63 (91,30%) женщины и 6 (8,69%) мужчин. ИМТ составил 27,3 кг/м² [21,8-49,2]. Критерии включения: возраст от 18 до 70 лет, наличие достоверного диагноза.

Для изучения диагностической ценности определения профиля АНА больные были разделены на 3 группы: 1-я – 15 пациентов (14 (93,3%) женщин, 1 (6,7%) мужчина) с системной красной волчанкой, 2-я – 21 больной (19 (90%) женщин и 2 (10%) мужчины) с болезнью и синдромом Шегрена (СШ), 3-я (контрольная) группа – 33 пациента (30 (91%) женщин и 3 (9%) мужчины) с остеоартритом. Все группы были сопоставимы между собой по полу и возрасту.

Диагнозы ставились на основании общепринятых клинических рекомендаций [3, 6, 7].

При выполнении работы был использован набор реагентов для определения антител IgG к ядерным антигенам методом иммуноблоттинга (EUROLINEANAProfile 3 (IgG), кат № DL 1590-1601-3), с помощью которого определялись следующие виды антител:

- RNP - антитела к белковым компонентам малого ядерного нуклеотида U-1-PHK;
- Sm - антитела к U1-, U2-, U4-рибонуклеопротеинам;
- SS-A native- антитела к бел-

Таблица 1

Частота выявления антинуклеарных антител при ревматических заболеваниях, %

Антитело	Группа пациентов согласно основному диагнозу			Достоверность, F-хест; p
	1-я с СКВ (n=15)	2-я с СШ (n=21)	3-я с остеоартрозом (n=33)	
RNP/Sm	5(30)	0(0)	0(0)	13,2; p<0,0001
Sm	5(30)	6(28,6)	0(0)	14,0; p=0,001
SS-A native	8(53,3)	11(52,4)	0(0)	28,19; p<0,0001
Ro-52 recombinant	2(13,33)	12(57,1)	0(0)	25,81; p<0,0001
SS-B	2(13,33)	4(19,0)	0(0)	6,88; p=0,017
Scl-70	0(0)	0(0)	0(0)	-
PM-Scl100	0(0)	2(9,52)	0(0)	3,28; p=0,134
Jo-1	0(0)	3(14,3)	0(0)	5,02; p=0,034
Centromere B	0(0)	0(0)	0(0)	-
PCNA	0(0)	0(0)	0(0)	-
dsDNA	5(30)	6(28,6)	0	13,97; p=0,001
Nucleosomes(NUC)	3(20)	2(9,52)	0(0)	6,24; p=0,025
HI	5(30)	0(0)	0(0)	13,16; p<0,0001
Ribosomal-P-protein (RIB)	0(0)	6(28,6)	0(0)	11,78; p<0,0001
AMA-M2	0(0)	0(0)	0(0)	-

кам, связанным с РНК Y1-Y5 в сплайсосомах;

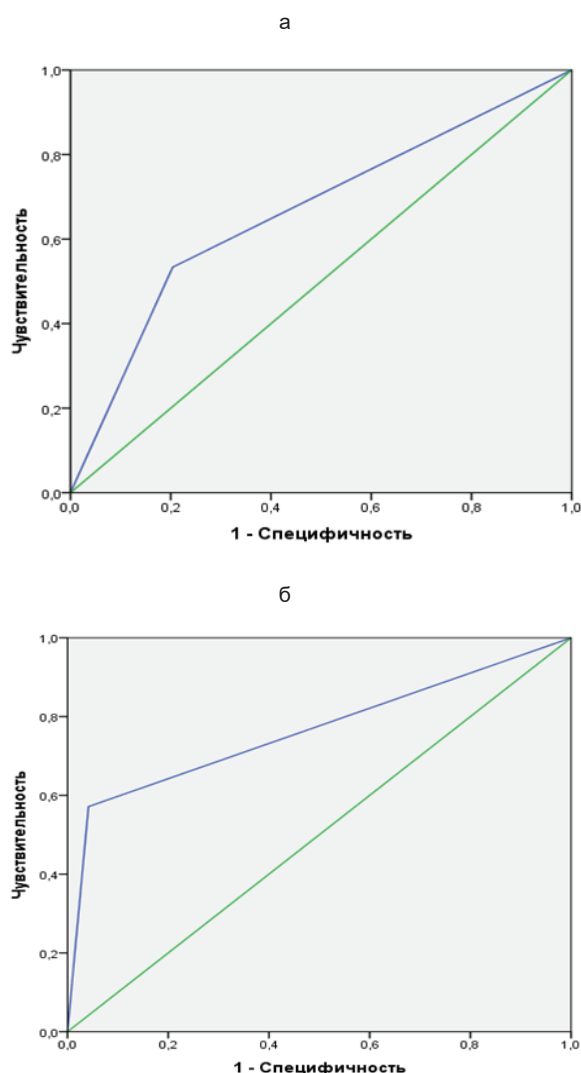
- Ro-52 recombinant – антитела к рекомбинантному антигену (белок 52 кДа);
- SS-B – антитела к белку, связанному с РНК-полимеразой-3
- Scl-70 – антитела к ДНК-топоизомеразе 1;
- PM-Scl100 – антитела к рекомбинантному антигену PM-Scl;
- Jo-1 – антитела к гистидин-тРНК-синтетазе,
- CENPB-антицентромерные антитела B;
- PCNA – антитела к ядерному антигену пролиферирующих клеток,
- dsDNA – антитела к двухцепочечной ДНК,
- NUC – антитела к нуклеосомам,
- HI – антитела к гистонам,
- RIB – антитела к рибосомальному белку Р,
- AMA-M2 – антимитохондриальные антитела.

Статистические расчёты производились с использованием программы STATISTICA 10.0. Пороговое значение в точке cut-off для выявлений СКВ и СШ определялось по определению точки наибольшего значения пересечения чувствительности и специфичности.

Результаты и обсуждение. Мы исследовали частоту выявления АНА при ревматических заболеваниях.

Из табл. 1 видно, что аутоантитела к экстрагируемому ядерным антигенам RNP/Sm, которые считаются традиционным критерием диагностики СКВ, были выявлены у 30% пациентов с СКВ. Антитела Sm к U1-, U2-, U4-рибонуклеопротеинам определялись у пациентов с СКВ и СШ. В 1-й и 2-й группах достоверно чаще определялись анти-SS-A native (53,3 и 57,1% соответственно). У половины пациентов с СШ выявлялись рекомбинантные анти-Ro-52. Статистически чаще по сравнению с 3-й группой у пациентов с СШ выявлялись анти-SS-B. У 3 пациентов с СКВ и 2 – с болезнью Шегрена выявлены анти-NUC. Анти-HI выявлялись достоверно чаще (30%) в группе пациентов с СКВ.

Далее мы определили чувствительность и специфичность лабораторных тестов при СКВ и СШ, что позволило выявить наиболее оптимальный метод, максимально подходящий для диагностики конкретной нозологии. Чувствительность теста определяется по формуле, которая показывает долю достоверных диагностических показате-



Рос-кривая, характеризующая диагностическую ценность определения анти-SS-A при СКВ (а) и анти- Ro-52 при СШ (б)

Таблица 2

Чувствительность и специфичность тестов на антитела, %

Антитело	СКВ		СШ	
	Чувствительность	Специфичность	Чувствительность	Специфичность
RNP/Sm	30	100	0	94
Sm	30	91	28,6	92
SS-A native	53,3	82	52,4	86
Ro-52 recombinant	13,3	82	57,1	96
SS-B	13,3	94	19,0	97
Scl-70	-	100	-	100
PM-Scl100	-	97	9,52	100
Jo-1	0,0	96	14,3	100
CENP B	-	100	-	100
PCNA	-	100	-	100
dsDNA	30	91	28,6	92
NUC	20	97	9,52	95
HI	30	100	28,6	93
RIB	-	91	28,6	100
AMA-M2	-	100	-	100

Таблица 3

Основные описательные характеристики ROC-кривой, характеризующей диагностическую ценность определения анти-SS-A при СКВ и анти- Ro-52 при СШ

	Анти-SS-A при СКВ	Анти- Ro-52 при СШ
Площадь под ROC-кривой	0,665	0,765
Стандартная ошибка	0,084	0,071
Доверительный интервал	0,499 - 0,830	0,65 - 0,905

телей пациентов с данным заболеванием. Специфичность определяется процентным содержанием достоверно отрицательных показателей среди здоровых лиц (табл. 2).

Наиболее чувствительным анти-телом для диагностики СКВ оказалось SS-A native (53,3%) при высоком уровне специфичности (82%). Несколько менее чувствительными были анти-RNP/SM, анти-Sm, анти-dsDNA и анти-HI (30%), с уровнем специфичности 91% для анти-dsDNA и анти-Sm и 100% для анти-RNP/Sm и анти-HI.

Наиболее информативными диагностическими тестами при болезни и синдроме Шегрена оказались анти-Ro-52 recombinant (чувствительность 57,1%, специфичность 96%) и анти-SS-A native (чувствительность 52,4%, специфичность 86%). Несколько менее чувствительными (28,6%) были анти-Sm (специфичность 92%) и анти-dsDNA (специфичность 92%) и анти-RIB (специфичность 100,0%). Чувствительность менее 20% показали анти-SS-B, PM-Scl100, Jo-1 и NUC.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что изучаемые в данной работе лабораторные тесты высокоспецифичны, что позволяет избежать гипердиагностики аутоиммунных заболеваний и лишнего назначения лекарственной терапии. При этом данные тесты можно охарактеризовать как низкочувствительные, в связи с чем для диагностики аутоиммунных заболеваний следует использовать классификационные критерии, разработанные международным сообществом и одобренные ассоциацией ревматологов России.

С помощью метода анализа ROC-кривых была построена модель, характеризующая вероятность наличия СКВ (рисунок, а) и СШ (рисунок, б) от значений анти-SS-A native и анти-Ro-52 соответственно, в связи с их наиболее высокими специфичностью и чувстви-

тельностью относительно других анти-тел.

Согласно табл. 3, лабораторный тест анти-SS-A при СКВ обладает хорошим качеством (площадь под ROC-кривой – 0,66). Нами было определено пороговое значение cut-off со специфичностью 79,6% и чувствительностью 53,3%.

Лабораторный тест анти-Ro-52 при СШ также обладает хорошим качеством, что подтверждает значение площади под ROC-кривой (>0,7). Оптимальное значение cut-off соответствовало 99,6% специфичности и 57,1% чувствительности.

Таким образом, с использованием дополнительных методов статистического анализа мы смогли подтвердить рассчитанные ранее чувствительность и специфичность определения анти-SS-A native для диагностики СКВ и анти-Ro-52 – для СШ.

Выводы. В нашем исследовании методом иммуноблоттинга были изучены основные маркёры аутоиммунных заболеваний соединительной ткани.

В группах пациентов с СКВ и СШ достоверно чаще наблюдались анти-SS-A native (53,3 и 52,4% соответственно). Антитела к гистонам достоверно чаще выявлялись с частотой 30% в группе пациентов с СКВ. Можно предположить, что экстрагируемые ядерные антигены имеют наибольшее диагностическое значение при СКВ, антитела к антигенам SS-A и Ro-52 – при СКВ и болезни (синдроме) Шегрена, а антинуклеарные антитела к гистонам более характерны для пациентов с СКВ.

Изученные лабораторные тесты, как правило, обладали высокой специфичностью, но достаточно малой чувствительностью. Наиболее специфичными тестами для диагностики СКВ являются антитела к антигенам RNP/Sm, SS-A native, антитела к гистонам,

для СШ – анти-SS-A native, анти-Ro-52 recombinant, анти-RIB.

Таким образом, данные тесты оптимально использовать для подтверждения конкретного нозологического диагноза у пациента с уже выявленным ревматологическим заболеванием, однако для скрининговых исследований с целью выявления ревматологической патологии в популяции данные тесты использовать нерационально.

Литература

1. Александрова Е.Н., Новиков А.А., Насонов Е.Л. Федеральные клинические рекомендации: лабораторная диагностика ревматических заболеваний. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. 26 с.
2. Aleksandrova E.N., Novikov A.A., Nasonov E.L. Federal clinical guidelines for laboratory diagnosis of rheumatic diseases M.: GEOTAR-Media. 2015. 26 s.
3. Клинические рекомендации по лабораторной диагностике аутоиммунных заболеваний / Лапин С.В. [и др.]. 2014.
4. Clinical guidelines for laboratory diagnosis of autoimmune diseases / Lapin S.V. [et al.]. 2014
5. Общероссийская общественная организация «Ассоциация ревматологов России». Клинические рекомендации по диагностике и лечению болезни Шегрена. 2013. 18 с.
6. All-Russian public organization "Association of Rheumatologists of Russia". Clinical guidelines for the diagnosis and treatment of Sjögren's disease. 2013. 18 p.
7. Delayed diagnosis adversely affects outcome in systemic lupus erythematosus: cross sectional analysis of the lula cohort / Kernder A [et al.] // *Lupus* 2021;30:431–8.
8. Different indirect immunofluorescence ANA substrate performance in a diagnostic setting of patients with SLE and related disorders: retrospective review and analysis / Choi M. Y [et al.] // *Lupus science & medicine*. 2020;7(1):e000431.
9. EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus: 2023 update / Fanouriakis A [et al.] // *Ann Rheum Dis*. 2023;0:1–15. doi:10.1136/ard-2023-224762.
10. European League Against Rheumatism/ American College of Rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus / Aringer M. [et al.] // *Annals of Rheumatic Diseases*, 2019; 78: 1151–1159.
11. Genetic Polymorphism of PTPN22 in Autoimmune Diseases: A Comprehensive Review / Tizaoui K [et al.] // *Medicina*. 2022; 58(8):1034. <https://doi.org/10.3390/medicina58081034>.
12. International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies / Agmon-Levin N [et al.] // *Ann Rheum Dis*. 2014 Jan;73(1):17–23.
13. Naghavi-Behzad M. Diagnostic value of Immunoblotting assay for determination of anti nuclear antibody (ANA) concentration in rheumatologic diseases. *Front. Immunol. Conference Abstract: 15th International Congress of Immunology (ICI)*. 2013doi: 10.3389/conf.fimmu.2013.02.00757.