

ЗНАЧЕНИЕ АНТИТЕЛ К ДЕЗАМИНИРОВАННОМУ ГЛИАДИНУ ПРИ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ЦЕЛИАКИИ

© Малкова А.М.¹, Будкова А.И.², Мазинг А.В.², Блинова Т.В.², Лапин С.В.², Малышкин К.А.²

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Российская Федерация

² Лаборатория диагностики аутоиммунных заболеваний НМЦ молекулярной медицины ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П.Павлова Минздрава России, Российская Федерация

Резюме. Введение. В последнее время большое внимание уделяется лабораторной диагностике целиакии, позволяющей избежать инвазивных методов, таких как биопсия тонкой кишки. К специфичным лабораторным методам относят определение антител к дезаминированным пептидам глиадина (ДПГА), аутоантител к тканевой трансглутаминазе (ТТГА) и эндомизию и генотипирование локусов HLA-DQ2/8. Для постановки диагноза достаточно наличие генотипов и аутоантител. Значимость определения антител к дезаминированным пептидам глиадина до сих пор остается спорным вопросом среди гастроэнтерологов. Цель. Оценить встречаемость ДПГА относительно наличия генотипов HLA-DQ2/8 и ТТГА у 332 пациентов. Материалы и методы. Для анализа определения ДПГА относительно наличия генетической предрасположенности к целиакии, а также сравнения с исследованием ТТГА мы проанализировали результаты исследований генотипирования и определения специфичных для целиакии антител у 332 пациентов, проходивших обследования в лаборатории диагностики аутоиммунных заболеваний ПСПбГМУ им. И.П.Павлова с 2014 по 2017 год. Результаты. Аутоантитела к тканевой трансглутаминазе были выявлены исключительно при наличии генотипов HLA-DQ2/8 ($p=0,047$), тогда как ДПГА определялись вне зависимости от генотипа, при этом высокий уровень ДПГА оказался более характерен для генетически предрасположенных лиц ($p=0,038$). У 55% (19/35) пациентов ДПГА и ТТГА выявлялись сочетано, в 35% (12/35) случаев уровень ДПГА составлял более 100 ед/мл. Выводы. Наше исследование показало, что ДПГА являются неспецифичным показателем целиакии, однако высокий уровень данных антител при отсутствии ТТГА позволяет заподозрить заболевание. Было доказано, что появление ТТГА характерно для носителей генотипов HLA-DQ2/8, а значит, определение данных аутоантител является специфичным методом при постановке диагноза целиакия.

Ключевые слова: целиакия, лабораторная диагностика, генотип, значимость, аутоантитела, глиадин.

DEAMIDATED GLIADINE PEPTIDE ANTIBODIES IN LABORATORY DIAGNOSTICS OF CELIAC DISEASE

© A.M. Malkova¹, A.I. Budkova², A.V. Mazing², T.V. Blinova², S.V. Lapin², K.A. Malyshekin²

¹ Saint Petersburg State University, medicine department, Russian Federation, Saint Petersburg

² Laboratory for the diagnosis of autoimmune diseases FSBEI HE I.P.Pavlov SPbSMU MOH, Russian Federation, Saint Petersburg

Introduction. Recently much attention has been paid to laboratory diagnostics of celiac disease, which allows avoiding invasive methods, such as small bowel biopsies. Specific laboratory methods include the determination of deaminated gliadin peptides (anti-DGP), autoantibodies to tissue transglutaminase (anti-tTG), endomysium (AEA) and genotyping of HLA-DQ2/8 loci. For the diagnosis is sufficient to have genotypes and autoantibodies. The importance of detecting anti-DGP is still a controversial issue among gastroenterologists. **The aim of the study.** To evaluate the occurrence of anti-DGP relative to the presence of HLA-DQ2/8 and anti-tTG genotypes among 332 patients. **Methods.** To assess the detection of anti-DGP and compare with the anti-tTG-test relative to genetic predisposition to celiac disease we analyzed the results of genotyping studies and the determination of celiac specific antibodies in 332 patients who were enrolled in the autoimmune disease diagnostic laboratory of the I.P. Pavlov SPbSMU from 2014 to 2017. **Results.** Autoantibodies to tissue transglutaminase were detected exclusively in the presence of genotypes HLA-DQ2/8 ($p=0.047$), whereas anti-DGP were determined regardless of the genotype, however high level of anti-DGP was more common for genetically predisposed individuals ($p=0.038$). 55% (19/35) of patients, anti-DGP and anti-tTG were combined, in 35% (12/35) of cases the level of anti-DGP was more than 100 units/ml. **Conclusion.** Our study shows that anti-DGP are nonspecific indicator of celiac disease, but a high level of these antibodies in the absence of anti-tTG allows to suspect the disease. It was proved that the presence of anti-tTG is characteristic for carriers of

HLA-DQ2/8 genotypes and therefore the determination of these autoantibodies is a specific method in the diagnosis of celiac disease.

Key words: celiac disease, laboratory diagnostics, genotype, significance, autoantibodies, gliadin.

ВВЕДЕНИЕ

Целиакия является одним из немногих аутоиммунных хронических заболеваний, для которого был точно определен антиген, запускающий патологические иммунные реакции. Триггером заболевания являются дезаминированные тканевой трансглутаминазой пептиды глиадина. Глиадин появляется при ферментативном расщеплении глютена — белка группы проламинов, которые входят в состав оболочек зерен таких злаковых как пшеница, овес, рожь. По неизвестной причине реакция иммунной системы на глиадин становится гиперэргической и сопровождается синтезом аутоантител к ферменту — тканевой трансглутаминазе. При этом поражается слизистый слой тонкого кишечника, что проявляется кишечной и внекишечной симптоматикой. Важно отметить, что целиакия встречается только при генотипах HLA-DQ2/8. Генетическая предрасположенность обуславливает способность HLA-DQ2/8 молекул антиген-презентирующих клеток более сильно связываться с дезаминированными пептидами глиадина [1–4].

Связь между развитием болезни и употреблением глютена была обнаружена уже давно, поэтому уже с 1972 года главным серологическим методом диагностики целиакии служило определение антител к глиадину, которое с 1983 осуществлялось преимущественно методом иммуноферментного анализа. Однако данная методика оказалось малоспецифичной, антитела обнаруживались как и при других заболеваниях (ревматоидный артрит, пемфигоид, сахарный диабет 1-го типа, системная красная волчанка, саркоидоз, болезнь Крона, энтероколиты), так и у здоровых людей, поэтому с 2001 года стали использовать антитела к синтетическим дезаминированным пептидам глиадина [5]. Исследование ДПГА было включено во многие критерии по диагностике целиакии, как скрининговый метод у детей до 2 лет, а также вместо определения ТТГА при IgA-дефиците [6–9].

В последнее время появляются противоречивые исследования по изучению ДПГА при диагностике целиакии. С одной стороны, многие педиатры и гастроэнтерологи предлагают определение ДПГА для оценки возможности развития целиакии или в качестве скринингового теста вместо определения ТТГА, при этом данный тест считается

высококчувствительным и высокоспецифичным [10–12]. С другой стороны, антитела к дезаминированным пептидам глиадина встречаются при некоторых аутоиммунных заболеваниях (аутоиммунном гепатите, саркоидозе, герпетиформном дерматите), воспалительных заболеваниях кишечника, а также при глютеновой энтеропатии, не связанной с целиакией [5, 13]. В связи с этим возникает вопрос о специфичности исследования ДПГА и оправданности его использования при диагностике целиакии.

Целью нашей работы являлся анализ встречаемости ДПГА относительно генотипа HLA-DQ2/8 и наличия аутоантител к тканевой трансглутаминазе для уточнения значимости теста для диагностики целиакии.

ОБСЛЕДУЕМЫЕ И МЕТОДЫ

В исследовании были проанализированы результаты серологических и генетических тестов у 332 пациентов, проходивших обследование в лаборатории диагностики аутоиммунных заболеваний ПСПбГМУ им. И.П. Павлова с 2014 по 2017 год в связи с подозрением на целиакию. Вся информация была получена при наличии добровольного информированного согласия пациентов с учетом анонимности.

Определение ТТГА (IgA) и ДПГА (IgG) осуществлялось с помощью метода иммуноферментного анализа сывороток обследуемых в соответствии с инструкцией производителя «EUROIMMUN», Германия. Положительный результат наличия ТТГА считается при обнаружении концентрации антител более 20 ед/мл, повышенный уровень ДПГА регистрируется при концентрации антител более 25 ед/мл.

При выявлении ЭМА (IgA) использовался метод непрямой реакции иммунофлуоресценции в соответствии с инструкцией производителя «BioSystems», Испания. Положительный результат считается при обнаружении концентрации антител в соотношении больше 1:5.

Генотипы **HLA-DQ2/8** определялись с помощью метода ПЦР в реальном времени в соответствии с инструкцией производителя «ДНК-Технология», Россия. К генотипам риска целиакии относят генотип **HLA-DQ8** (аллели: HLA-DQB1*03:02, HLA-DQA1*03) и генотип **HLA-DQ2**, к которому относят генотипы HLA-DQ2.5 (аллели HLA-DQA1*05,

HLA-DQB1*02) и HLA-DQ2.2 (аллели HLA-DQA1*02, HLA-DQB1*02) [14].

Все результаты исследований были занесены в базу данных на основе программного обеспечения Microsoft Office (Microsoft Excel). Для оценки статистической значимости результатов по методу хи-квадрат и анализа непараметрических выборок по методу Манна-Уитни использовалось программное обеспечение GraphPad Prism6.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для анализа распределения серологических показателей целиакии в зависимости от HLA-генотипа, были изучены результаты определения ДПГА, ТТГА и генотипирования HLA-DQ2/8 локусов 332 пациентов.

Антитела к дезаминированным пептидам глиадина сочетано с генотипом HLA-DQ2/8 были исследованы у 218 пациентов. Среди них 122 человека оказались носителями генотипа риска, высокий уровень ДПГА в данной группе был выявлен у 9,0% (11/122). Среди пациентов с отсутствием генотипа риска целиакии высокие концентрации ДПГА определялись у 4,2% (4/96).

При анализе распределения повышенных уровней ДПГА относительно наличия генотипа HLA-DQ2/8 оказалось, что высокие концентрации антител (более 100 ед/мл) встречаются только среди генетически предрасположенных лиц (рис. 1).

Исследования ТТГА и генетической предрасположенности были выполнены у 124 пациентов. Среди них генотип HLA-DQ2/8 был выявлен у 75 человек, отсутствие генетической предрасположенности — у 49. Среди обследуемых с генотипом HLA-DQ2/8 ТТГА определялись у 12% (9/75), тогда как у пациентов без генетической предрасположенности в 2% случаев (1/49) (Тест Фишера, $p=0,047$).

Для анализа сочетаемости наличия ТТГА и повышенного уровня ДПГА были исследованы результаты определения ТТГА и ДПГА у 35 пациентов. В 55% (19/35) случаев данные серологические показатели были выявлены сочетано, при этом у 35% (12/35) уровень ДПГА оказался более 100 ед/мл. У 14% (5/35) пациентов был обнаружен только повышенный уровень ДПГА, но менее 100 ед/мл. Наличие только ТТГА было выявлено среди 31% (11) пациентов, при этом только у 18% (2/11) пациентов уровень аутоантител составил более 200 ед/мл (рис. 2).

Для анализа сочетания ДПГА, ТТГА относительно наличия генотипов HLA-DQ2/8 были отобраны результаты исследований у 61 паци-

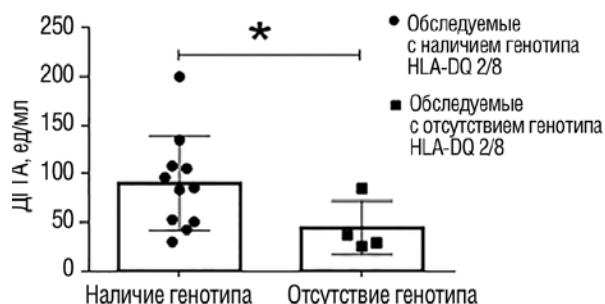


Рис 1. Уровень антител к дезаминированным пептидам глиадина (ДПГА) у 15 пациентов генотипированных по локусу HLA-DQ2/8 ($p=0,038$)

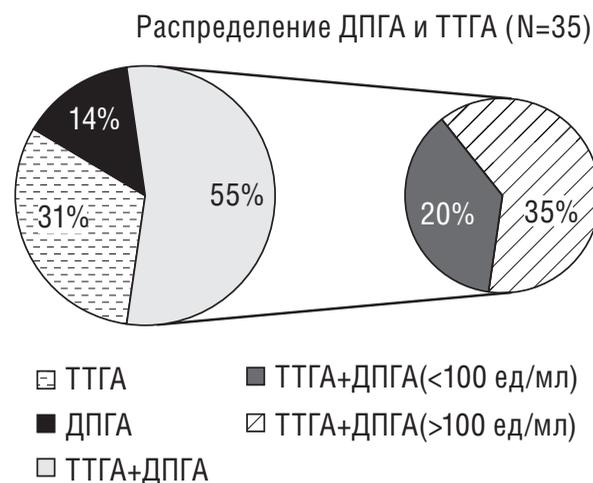


Рис 2. Распределение высоких показателей ДПГА и наличия ТТГА среди 35 пациентов

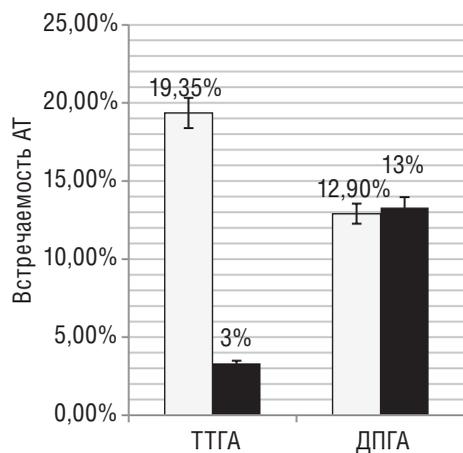
ента, проходивших обследования на выявление специфических антител и генотипа.

Генетическая предрасположенность среди пациентов данной группы была выявлена в 50,8% (31/61) случаев. Среди представителей генотипа риска целиакии ДПГА встречались у 12,90% (4/31), тогда как у пациентов с отсутствием генотипа ДПГА были выявлены у 13,3% (4/30), при этом уровень ДПГА в данной группе составлял менее 100 ед/мл.

Аутоантитела к тканевой транслугтаминазе были обнаружены у 19,35% (6/30) пациентов с генетической предрасположенностью и у 3,3% (1/30) пациентов, не несущих генотип HLA-DQ2/8 (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Глиадин является пищевым белком, при употреблении которого может возникнуть не только аллергическая реакция с продукцией IgE, но также иммуновоспалительный ответ



- Обследуемые с наличием генотипа HLA-DQ 2/8 (31)
 ■ Обследуемые с отсутствием генотипа HLA-DQ 2/8 (30)

Рис. 3. Встречаемость повышенных значений антител к тканевой трансглутаминазе (ТТГА), дезаминированным пептидам глиадина (ДПГА) при наличии и отсутствии предрасположенности к целиакии среди 61 пациента, имеющих полный комплекс обследований

замедленного типа с синтезом антител IgA и IgG. У носителей генотипа HLA-DQ2/8 помимо этого развивается и аутоиммунная реакция с продукцией аутоантител к ферменту — тканевая трансглутаминаза [3].

Основным патогенетическим фактором развития воспалительной реакции на глютен является повышенная проницаемость слизистого слоя кишечника, которая может быть обусловлена генетическими изменениями межклеточных контактов энтероцитов или временным нарушением целостности слизистого слоя при различных воспалительных заболеваниях [15]. Сам глиадин также способен разрушать межклеточные связи, представленные зонулином, что способствует его проникновению в подслизистый слой, где молекула подвергается модификации с помощью фермента тканевой трансглутаминазы. В норме энзим осуществляет реакцию трансаминирования, однако при изменении условий, например, повышения уровня кислотности, что наблюдается при воспалении, тканевая трансглутаминаза дезаминирует глутамин глиадина с образованием отрицательно заряженной глутаминовой кислоты [1, 2, 4, 16].

При целиакии у носителей генотипа HLA-DQ2/8 дезаминированные пептиды глиадина благодаря отрицательному заряду способны образовывать более прочные связи с молекулами HLA-DQ2/8. Происходит активация В-лимфоцитов с образованием антител к дезаминированным пептидам глиадина, а также развивается аутоиммунная реакция с образо-

ванием аутоантител к тканевой трансглутаминазе. Наблюдается воспаление и последующая атрофия слизистой тонкой кишки [1, 5].

Лабораторная диагностика целиакии основана на выявлении генетической предрасположенности — наличие генотипов HLA-DQ2/8, и показателей аутоиммунной реакции — наличие аутоантител к тканевой трансглутаминазе и эндомизию. В качестве скрининга рекомендовано исследование ТТГА, однако некоторые гастроэнтерологи предлагают в качестве скринингового теста определение ДПГА, особенно для детей младше 2 лет [5–9].

В нашем исследовании мы хотели оценить значимость ДПГА при лабораторной диагностике целиакии, сравнив результаты определения ДПГА и ТТГА относительно наличия генотипов HLA-DQ2/8.

Согласно нашему исследованию ДПГА обнаруживались независимо от генотипа HLA-DQ2/8, а значит, данный серологический показатель не является специфичным для целиакии, в то время как ТТГА были обнаружены исключительно у генетически предрасположенных лиц. Однако было показано, что для носителей генотипа HLA-DQ2/8 более характерны высокие показатели ДПГА — более 100 ед/мл.

Аутоантитела к тканевой трансглутаминазе можно обнаружить у детей старше 2 лет, поэтому если в качестве скрининга использовать определение ДПГА, то стоит учитывать концентрацию более 100 ед/мл. Наличие высокой концентрации ДПГА при отсутствии ТТГА у генетически предрасположенных лиц может свидетельствовать о начале заболевания. В старшем возрасте более информативным является определение ТТГА.

Наличие только ДПГА можно обнаружить как при других аутоиммунных заболеваниях, так и при различных воспалительных заболеваниях кишечника [13,17,18]. Поэтому при выявлении повышенного уровня ДПГА на фоне отсутствия ТТГА и генетической предрасположенности к целиакии рекомендуется провести ряд исследований тонкой кишки, а также показателей некоторых аутоиммунных заболеваний.

Анализ встречаемости ДПГА и ТТГА показал, что в половине случаев (54%) данные серологические показатели выявляются сочетано, при этом у большинства лиц уровень ДПГА составлял более 100 ед/мл. Было доказано, что уровень ДПГА и ТТГА соответствует степени поражения слизистой тонкой кишки, поэтому, возможно, ДПГА можно использовать в качестве дополнительного теста для оценки воспаления и атрофии ворсинок кишечника [19].

В исследовании также были обнаружены случаи изолированного наличия ТТГА. При уровне ТТГА менее 200 ед/мл при отсутствии повышенного уровня ДПГА, можно предположить, что данную серологическую картину можно встретить на начальных этапах безглютеновой диеты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Антитела к дезаминированным пептидам глиаина оказались неспецифичным показателем при лабораторной диагностике целиакии. Однако при отсутствии возможности определения аутоантител к тканевой транслугтаминазе в качестве скрининга возможно использование ДПГА при уровне более 100 ед/мл.

Была показана высокая специфичность определения ТТГА при лабораторной диагностике целиакии, следовательно, определение данного показателя рекомендовано в качестве скрининга, а также при постановке диагноза у носителей генотипов HLA-DQ2/8.

Наличие высоких концентраций ДПГА при генетической предрасположенности к целиакии на фоне отсутствия ТТГА не исключает заболевание и требует постоянного контроля серологических показателей целиакии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Stamaes J., Sollid L.M. Celiac disease. Autoimmunity in response to food antigen. *Semin Immunol* 2015 Sep; 27(5):343–52.
2. Korponay-Szabo I.R., Vecsei Z., Kiraly R., Dahlbom I. Deamidated Gliadin Peptides Form Epitopes That Transglutaminase Antibodies Recognize. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008. Vol. 46, № 3. P. 253–261.
3. De Re V., Caggiari L., Tabuso M., Cannizzaro R. The versatile role of gliadin peptides in celiac disease. *Clin Biochem.* 2013 Apr;46(6):552–60.
4. Lindfors K., Mäki M., Kaukinen K. Transglutaminase 2-targeted autoantibodies in celiac disease: Pathogenetic players in addition to diagnostic tools? *Autoimmun Rev.* 2010 Sep;9(11):744–9.
5. Вохмянина Н.В. Лабораторная диагностика целиакии: принципы и алгоритмы. Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук. Санкт-Петербург 2016.
6. Husby S., Koletzko S., Korponay-Szabo I.R., Mearin M.L., Phillips A., Shamir R., Troncone R., Giersiepen K., Branski D., Catassi C., Lelgeman M., Maki M., Ribes-Koninckx C., Ventura A., Zimmer K.P. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012 Jan;54(1):136–60.
7. Rubio-Tapia Alberto, Hill Ivor, Kelly Ciarán, Calderwood Audrey, Murray Joseph. American college of gastroenterology clinical guideline diagnosis and management of celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 2013 May; 108(5): 656–677.
8. Ludvigsson Jonas, Bai Julio, Biagi Federico, Card Timothy, Ciacci Carolina, Ciclitira Paul, Green Peter, Hadjivassiliou Marios, Holdaway Anne, van Heel David, Kaukinen Katri, Leffler Daniel, Leonard Jonathan, Lundin Knut, McGough Norma, Davidson Mike, Murray Joseph, Swift Gillian, Walker Marjorie, Zingone Fabiana, Sanders David. Diagnosis and management of adult coeliac disease: guidelines from the British Society of Gastroenterology. June 10, 2014.
9. Bai C. J., Ciacci C., Corazza G.R., Fried M., Olano C., Rostami-Nejad M., González A., Green P., Gutierrez-Achury J., Schultz M., Verdú E., Barada K., Gibson P., Koletzko S., Coton T., Mulder C., Makharia G., LeMair A. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines Celiac Disease. July 2016
10. Amarri S., Alvisi P., De Giorgio R., Gelli, Cicola R., Tovoli F., Sassatelli R., Caio G., Volta U. Antibodies to deamidated gliadin peptides: an accurate predictor of coeliac disease in infancy. *J Clin Immunol.* 2013 Jul;33(5):1027–30.
11. Kaukinen K., Collin P., Laurila K., Kaartinen T., Partanen J., Mäki M. Resurrection of gliadin antibodies in coeliac disease. Deamidated gliadin peptide antibody test provides additional diagnostic benefit. *Scand J Gastroenterol.* 2007 Dec;42(12):1428–33.
12. Anne Lammi, Pekka Arikoski, Satu Simell, Tuure Kinnunen, Ville Simell, Sari Paavanen-Huhtala, Ari Hinkkanen, Riitta Veijola, Mikael Knip, Jorma Toppari, Outi Vaarala, Olli Simell, Jorma Ilonen. Antibodies to Deamidated Gliadin Peptide in Diagnosis of Celiac Disease in Children. *JPGN* 2015;60: 626–631
13. Armstrong D., Don-Wauchope A.C., Verdu E.F. Testing for gluten-related disorders in clinical practice: the role of serology in managing the spectrum of gluten sensitivity. *Can J Gastroenterol.* 2011 Apr;25(4):193–7.
14. Тотолян А.А., Алешина Л.А., Марфичева Н.А., Зуева Е.Е., Лапин С.В. Медицинские стандарты иммунологического обследования больных с аллергическими нарушениями и нарушениями иммунной системы. *Медицинская иммунология.* 2002. Т. 4. № 2. С. 379.
15. Martin F. Kagnoff. Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. *J Clin Invest.* 2007 Jan 2; 117(1): 41–49.
16. Jennifer M. Barker, Edwin Liu. Celiac Disease: Pathophysiology, Clinical Manifestations and Associated Autoimmune Conditions. *Adv Pediatr.* 2008; 55: 349–365.
17. Вохмянина Н.В., Грачев А.В., Лапин С.В., Лебедин Ю.С., Эмануэль В.Л. Тканевая транслугтаминаза (tg2) и антитела к тканевой транслугтаминазе при воспалительных заболеваниях кишечника. *Вестник Санкт-Петербургской государственной медицинской академии им. И.И. Мечникова.* 2009. № 1. С. 135–139.
18. Catassi Carlo, Elli Luca, Bonaz Bruno, Bouma Gerd, Carroccio Antonio, Castillejo Gemma, Cellier Christophe, Cristofori Fernanda, de Magistris Laura, Dolinsek Jernej, Dieterich Walburga, Francavilla Ruggiero, Hadjivassiliou Marios, Holtmeier Wolfgang, Körner Ute, Leffler Dan A., Knut E. A. Lundin, Mazzarella Giuseppe, Chris J. Mulder, Nicoletta Pellegrini, Kamran Rostami, David Sanders, Gry Irene Skodje, Detlef Schuppan, Reiner Ullrich, Umberto Volta, Marianne Williams, Victor F. Zavallos, Yurdagül Zopf, Alessio Fasano.: Diagnosis of Non-Celiac Gluten Sensitivity (NCGS): The Salerno Experts' Criteria. *Nutrients.* 2015 Jun; 7(6): 4966–4977.
19. Luc de Chaisemartin, Tchao Meatchi, Georgia Malamut, Fahima Fernani-Oukil, Frédérique Hosking, Dorothée Rault, Fabienne Bellery, Christophe Cellier, Marie-Agnès Dragon-Durey. Application of Deamidated Gliadin Antibodies in the Follow-Up of Treated Celiac Disease. *PLoS One.* 2015; 10(8): e0136745.