

УДК 616.711-002-007.274-085.275.2.036:612.017.1

DOI: 10.14427/jipai.2018.4.21

Дезоксирибонуклеазная активность сыворотки крови и антинуклеарные антитела при анкилозирующем спондилите на фоне длительной терапии инфликсимабом

Д.М. Петрович, Е.В. Кундер

Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь

Serum deoxyribonuclease activity and anti-nuclear antibodies in ankylosing spondylitis during longterm infliximab therapy

D.M. Petrovich, E.V. Kunder

Belarussian Medical Academy of Post-Graduate Education, Minsk, Belarus

Аннотация

В ходе динамического наблюдения 53 пациентов с анкилозирующим спондилитом, получавших длительно терапию инфликсимабом, оценено наличие антинуклеарных антител (АНА) и определена дезоксирибонуклеазная (ДНКазной) активность сыворотки крови исходно и на 30-ой неделе наблюдения с целью изучения возможности использования изученных показателей в качестве предикторов вторичной резистентности к инфликсимабу.

Положительный ядерный тип АНА определен исходно у 3,77%, на 30-неделе наблюдения серопозитивными по АНА стали 37,21% пациентов. В группе сравнения не выявлено АНА-положительных результатов. Частота встречаемости АНА при АС была при исходной оценке сопоставима со здоровыми лицами ($p > 0,05$). Частота встречаемости АНА на 30-ой неделе лечения оказалась достоверно выше, чем при исходной оценке ($p < 0,0001$).

У АНА-позитивных на 30-ой неделе терапии инфликсимабом пациентов с АС наблюдается достоверно более высокий уровень ДНКазной активности сыворотки крови ($p < 0,0001$).

Обнаружение на 30-ой неделе терапии инфликсимабом ДНКазной активности сыворотки крови 4 и более баллов позволяет прогнозировать вторичную резистентность к инфликсимабу на 54-ой неделе по критерию достижения целевых уровней ASDAS CRP, что является основанием для коррекции проводимого лечения.

Ключевые слова

Анкилозирующий спондилит, антинуклеарные антитела, ДНКазная активность сыворотки, инфликсимаб, резистентность.

Summary

During the dynamic observation of 53 patients with ankylosing spondylitis who received long-term therapy with infliximab, the presence of antinuclear antibodies (ANA) was evaluated and the deoxyribonuclease (DNase) serum activity was determined initially and at the 30th week of observation in order to study the possibility of using the studied parameters as predictors of secondary resistance to infliximab.

Positive nuclear type ANA was determined initially in 3,77%, in the 30-week follow-up 37.21% patients were ANA seropositive. In the comparison group, ANA-positive results were not detected. The frequency of occurrence of ANA in AS was, at baseline, comparable to healthy individuals ($p > 0,05$). The incidence of ANA at the 30th week of treatment was significantly higher than at baseline ($p < 0,0001$).

At the 30th week of infliximab treatment ANA-positive patients showed a significantly higher level of DNase serum activity than ANA-negative ones ($p < 0,0001$). DNase serum activity correlates with ANA-positivity ($r = 0,65$; $p < 0,0001$) in patients with AS who are receiving infliximab for a long time. Detection of serum DNase activity level of 4 units or more on the 30th week of infliximab therapy allows predicting secondary resistance to infliximab at 54th week according to the criterion of achieving target levels of ASDAS CRP, which is the basis for the correction of the treatment.

Keywords

Ankylosing spondylitis, antinuclear antibodies, serum DNase activity, infliximab, resistance.

На фоне длительной терапии инфликсимабом возможно развитие феномена угасания эффекта. В значительной степени угасание эффекта связывают с развитием иммуногенности – выработки связывающих и/или нейтрализующих антител к моноклональным антителам, которые непосредственно влияют на эффективность генно-инженерных базисных средств, модифицируя их фармакокинетику и фармакодинамику. Однако существует ряд проблем их детекции: отсутствие учета связанных антител, а не только свободных, образование иммунных комплексов, присутствие ревматоидного фактора, интерференция с лекарственным препаратом и др. [1].

Согласно литературным данным [2] установлено повышение антинуклеарных антител (АНА) при АС на фоне длительной терапии инфликсимабом. Учитывая наш предыдущий опыт определения уровней сывороточной ДНКазной активности при таких заболеваниях, как спондилоартриты (SpA) [3,4], ревматоидный артрит (РА) [1,3], представляет несомненный интерес оценка активности ряда энзимов в качестве возможного маркера вторичной резистентности к терапии инфликсимабом.

Целью данного исследования является стандартизированная оценка АНА при АС, определение ДНКазной активности сыворотки крови, выявление взаимосвязей между наличием антител и сывороточной ДНКазной активностью, возможность использования изученных показателей в качестве предикторов эффективности лечения инфликсимабом.

Материалы и методы

Исследование одобрено этическим [5] комитетом и носит наблюдательный сплошной характер с ретроспективным анализом, пациентами подписано информированное согласие.

На АНА и сывороточную ДНКазную активность протестированы сыворотки крови 53 пациентов с достоверным диагнозом АС [6]. Большинство пациентов были мужчинами (83,02%), средний возраст группы $37,19 \pm 9,38$ лет, при этом различий по возрасту между пациентами разного пола не было. Все пациенты были носителями HLA-B27 антигена (100%). Развернутая стадия наблюдалась у 41 пациента (77,36%), поздняя – у 12 пациентов (22,64%). Изолированное аксиальное поражение было у 24 пациентов (45,28%), коксит у 11 пациентов (20,75%), периферический артрит у 16 пациентов (30,19%), рецидивирующие синовиты коленных суставов – у 2 пациентов (3,77%). Кроме того, увеит выявлен у 8 (15,09%),

дактилиты у 7 (13,21%), а энтезопатии – у 27 (почти половина группы). Высокая активность выявлена у 21 (39,62%) пациентов, очень высокая – у 32 пациентов (60,38%). Умеренная и низкая активность АС в данной группе не выявлялась. ФН 1 степени была определена у 30 пациентов (56,60%), ФН 2 степени – у 19 пациентов (35,85%) и у 4 пациентов (7,55%) – ФН 3 степени. Коморбидная патология у пациентов данной группы была представлена: гастропатией (42 (79,25%)), язвенной болезнью 12-перстной кишки у 1 пациента (1,89%), артериальной гипертензией 1-2 степени риск 2 (7 (13,21%)), мужским бесплодием (1 (1,89%)), амилоидозом почек (1 (1,89%)). У 1 пациента (1,89%) имелся рецидивирующий перихондрит ушных раковин.

Все пациенты получали лечение НПВС, длительность терапии составила 60 месяцев (95%ДИ: 43,11-80,00) (Min-Max: 4,00-280,00; 25%-75%: 29,00-110,00). Терапия традиционными синтетическими болезнью-модифицирующими лекарственными средствами была назначена 25 пациентам (47,17%), в том числе сульфасалазин двадцати и метотрексат – 5. Терапию глюкокортикостероидами локально (внутриартикулярно и/или периартикулярно) получали 20 пациентов (37,74%).

Все 53 пациента (100%) прошли обследование и лечение инфликсимабом до 30-ой недели включительно. Лечение инфликсимабом в течение года получили 42 пациента из 53 (79,25%), все эти пациенты прошли полное обследование в течение 54 недель. У 11 пациентов из 53 (20,75%) терапия инфликсимабом была прекращена по следующим причинам и следующие сроки: аллергическая реакция (крапивница) у 2 пациентов на 30-ой (после 6 введений) и 38-ой неделе (после 7-го введения), рак предстательной железы у 1 пациента диагностирован на 38-ой неделе наблюдения (выполнено всего 6 введений инфликсимаба), положительный квантифероновый тест у 3 пациентов на 30-ой неделе наблюдения (выполнено 6 введений инфликсимаба), парадоксальный побочный эффект – псориаз у 2 пациентов на 12-ой и 14-ой неделях терапии соответственно, выполнено 6 инфузий, 3 пациента прекратили лечение по причине потери эффекта, из них в 2-х случаях наблюдался первичный не ответ, выполнено 6 инфузий, а в 1 случае – потеря эффекта после 6 инфузий, 1 пациент прекратил лечение на 30-ой неделе (выполнено 6 инфузий) по финансовым причинам.

Пациенты, получавшие лечение инфликсимабом, были разделены на 2 группы. Лечение

признавалось эффективным при достижении ASDAS CRP $\geq 2,1$ на 54-ой неделе лечения (24 пациента), неэффективным - при ASDAS CRP $\geq 2,1$ (18 пациентов). В группе пациентов с установленной неэффективностью лечения (группа 2) у 10 пациентов (55,55%) наблюдалось увеличение ASDAS CRP более чем на 1,1 на 54 неделе после достижения значимого клинического эффекта на 30-й неделе, что свидетельствует о развитии вторичной резистентности к лечению.

Контрольную группу составили по типу случай-контроль, включив в нее 33 здоровых добровольца.

Исследование АНА проводили исходно (до начала терапии инфликсимабом) и на 30-неделе лечения (перед 7 введением инфликсимаба). Наличие АНА определяли методом НИФ на автоматизированной системе AKLIDES с использованием соответствующих реагентов фирмы Medipan (Германия) в титре сыворотки 1/80. Для постановки реакций ДНКазной активности сыворотки крови использовалась ДНК тимуса теленка, («Sigma», США) [7,8]. Результат оценивали по образованию сгустка. Учет реакции проводили визуально в баллах.

Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью программно-аналитического прикладного пакета Statistica 7.0 и системы Medcalc 12.5.0.0.

Результаты

При автоматизированном определении АНА на анализаторе AKLIDES проведена стандартизованная количественная оценка интенсивности флуоресценции, определен тип свечения образцов. Результаты определения АНА были автоматически архивированы в памяти анализатора.

Положительный ядерный тип АНА определен исходно у 2 пациентов из 53 (3,77%) (в одном случае тип свечения ядрышковый, в другом – крапчатый), на 30-неделе наблюдения серопозитивными по АНА стали 16 пациентов из 43 (37,21%). В группе сравнения не выявлено АНА-положительных результатов (0,00%). Частота встречаемости АНА при АС была при исходной оценке сопоставима со здоровыми лицами ($p > 0,05$). Частота встречаемости АНА на 30-ой неделе лечения достоверно выше, чем частота встречаемости АНА при исходной оценке ($p < 0,0001$).

Все пациенты были разделены на 2 группы – с позитивным ядерным свечением и негативным ядерным свечением на 30-ой неделе наблюдения. В группе АНА-позитивных на 30-ой неделе лечения пациентов было пациентов с аксиальной

формой – 8 (50,0%), с кокситом - 5 (21,25%), с периферическим суставным синдромом – 3 (18,75%), с увеитом – 2 (12,5%), сочетание коксита с увеитом было у 2 пациентов (12,5%).

В группе АНА-негативных пациентов на 30-ой неделе лечения пациентов было пациентов с аксиальной формой – 16 (43,24%), с кокситом - 5 (13,51%), с периферическим суставным синдромом – 14 (37,84%), 2 пациента имели рецидивирующие синовиты крупных суставов (5,41%), пациентов с увеитом было 4 (10,82%). В исследуемых группах не получено достоверных различий по основным клиническим признакам заболевания.

В группе АНА-позитивных пациентов наблюдались следующие нежелательные явления на фоне терапии инфликсимабом: повышение трансаминаз – 1 пациент (на 30-ой неделе терапии), кожный псориаз *de novo* (парадоксальный побочный эффект) – 2 пациента (на 12-ой и 14-ой неделях терапии соответственно), внегоспитальная пневмония – 1 пациент (на 30-ой неделе терапии), крапивница – 1 пациент (на 30-ой неделе). В группе АНА-негативных пациентов нежелательные явления были представлены внегоспитальной пневмонией – 1 пациент (на 30-ой неделе) и крапивницей – у 1 пациента (на 30 неделе).

Таким образом, наблюдалось статистически высокодостоверное различие ДНКазной активности сыворотки крови у АНА-позитивных и АНА-негативных пациентов на 30-неделе терапии и отсутствие различий при исходной оценке, при установленной ($p < 0,0001$) заметной ($r = 0,65$) ранговой корреляции между ДНКазной активностью и АНА-позитивностью.

Факт взаимосвязи между ДНКазной активностью сыворотки крови и АНА-позитивностью с научной точки зрения является чрезвычайно интересным и находит свое объяснение с учетом современных представлений о механизмах клеточной смерти и теории внеклеточных нейтрофильных ловушек. При АС активно обсуждается участие измененных процессов клеточной смерти в патогенезе заболевания [9,10,11, 12, 13], что в свою очередь может быть причиной активации ДНКазной активности сыворотки крови. Повышение ДНКазной сывороточной активности по видимому имеет приспособительное значение, так как она способствует разрушению избытка нуклеиновых кислот, появляющихся в результате цитолиза.

Как известно, инфликсимаб может вызывать волчаночноподобный синдром (лекарственную волчанку). Исходя из механизмов ее развития

[14] наиболее вероятным в данном случае является появление аутоантигенов вследствие усиления апоптоза лекарственным препаратом или его метаболитическими производными [10, 15].

На фоне использования инфликсимаба возникает дополнительный риск цитолиза и нуклеолиза, что объясняет формирование волчаночно-подобного синдрома вследствие распознавания ДНК в качестве аутоантигена иммунокомпетентными клетками и появление АНА. Повышение ДНКазной активности сыворотки крови в данном случае, по-видимому, имеет приспособительный характер, защищает клетки и ткани от избыточного повреждения и имеет противовоспалительную направленность.

Любопытно, что установленное опытным путем противовоспалительное действие ДНКазы в отношении выброса нейтрофильных ловушек при моделировании на лабораторных мышах сепсиса [16] и повреждения тканей, индуцированного введением змеиного яда *E. Carunatus* [17], позволяет искать дальнейшие пути ее применения в качестве терапевтического агента.

Нами впервые предпринята попытка использовать повышенную ДНКазную активность сыворотки крови при длительной терапии инфликсимабом пациентов с АС в качестве маркера эффективности проводимой терапии.

При выполнении ROC-анализа ответа на инфликсимаб на 54-ой неделе терапии по критерию ASDAS CRP < 2,1 (низкая активность заболевания и отсутствие активности) на основе определения ДНКазной активности сыворотки крови было установлено, что в случае ДНКазой активности сыворотки крови, равной 4 (cut-off) и более баллов, на 54-ой неделе отсутствует эффективность терапии инфликсимабом по критерию достижения целевых уровней ASDAS CRP. ROC-кривая представлена на рисунке 1.

Показатели ROC-анализа представлены в таблице 2.

При дальнейшем выделении из группы пациентов, не достигших эффективности лечения инфликсимабом на 54-ой неделе, пациентов с вторичной резистентностью к инфликсимабу было продолжено изучение возможной взаимосвязи повышенной ДНКазной активности сыворотки крови и вторичной резистентностью к инфликсимабу. При выполнении ROC-анализа теста прогнозирования вторичной резистентности к инфликсимабу на 54-ой неделе терапии на основе определения ДНКазной активности сыворотки крови было установлено, что в случае ДНКазой активности сыворотки крови, равной 4 (cut-off) и более баллов, на 54-ой неделе развивается вторичная резистентность к инфликсимабу. ROC-кривая представлена на рисунке 2.

Показатели ROC-анализа представлены в таблице 3.

Выводы

1. У АНА-позитивных пациентов с АС на 30-ой неделе терапии инфликсимабом наблюдается достоверно более высокий уровень ДНКазной активности сыворотки крови.
2. Обнаружение на 30-ой неделе терапии инфликсимабом уровня ДНКазной активности сыворотки крови 4 и более баллов позволяет прогнозировать неэффективность по критерию достижения целевых уровней ASDAS CRP и вторичную резистентность к инфликсимабу на 54-ой неделе, что является основанием для коррекции проводимого лечения.

Таблица 1. ДНКазная активность сыворотки крови на фоне терапии инфликсимабом при оценке исходно и на 30-неделе наблюдения (результаты представлены как средняя и 95% доверительный интервал для средней)

Показатель	АНА-позитивные пациенты, n=16	АНА-негативные пациенты, n=37	Значимость различий
ДНКазная сывороточная активность исходно, баллы	3,81 3,29-4,34	3,31 2,89-3,74	p=0,072
ДНКазная сывороточная активность*, баллы	4,94 4,80-5,00	4 3,73-4,28	p<0,0001

Примечание -*: результаты оценивались на 30-й неделе терапии инфликсимабом

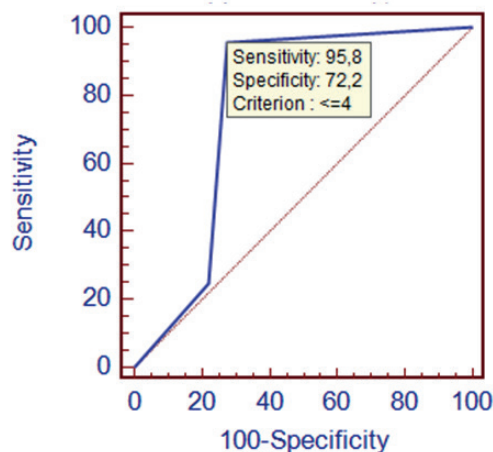


Рис. 1. ROC-кривая теста оценки эффективности терапии АС инфликсимабом на 54-ой неделе по результатам определения сывороточной ДНКазной активности

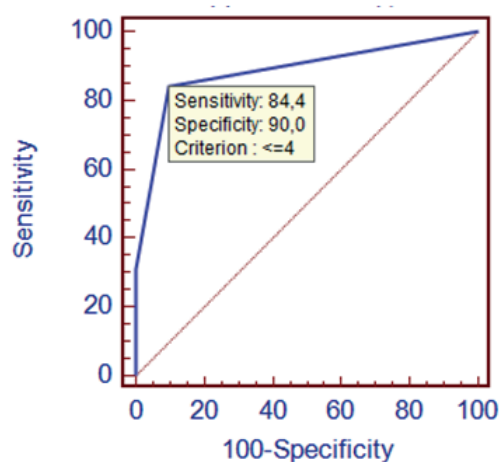


Рис. 2. ROC-кривая теста оценки вторичной резистентности к инфликсимабу на 54-ой неделе по результатам определения сывороточной ДНКазной активности

Таблица 2. Показатели ROC-анализа теста диагностики неэффективности лечения инфликсимабом на 54-ой неделе терапии по результатам определения ДНКазной активности сыворотки крови на 30-ой неделе терапии

Показатели ROC-анализа	Значения
Площадь под ROC-кривой (AUC)	0,769
Стандартная ошибка	0,076
95% Доверительный интервал	0,61-0,88
Уровень значимости (p)	0,0004

Таблица 3. Показатели ROC-анализа теста диагностики неэффективности лечения инфликсимабом на 54-ой неделе терапии по результатам определения ДНКазной активности сыворотки крови на 30-ой неделе

Показатели ROC-анализа	Значения
Площадь под ROC-кривой (AUC)	0,887
Стандартная ошибка	0,072
95% Доверительный интервал	0,75-0,96
Уровень значимости (p)	0,0001

Литература

1. Кундер Е.В. Иммуногенность блокаторов фактора некроза опухоли альфа как причина резистентности к терапии. Лечебное дело. 2017; 2(54): 55-65.
2. Gonnet-Gracia C., Barnette T., Richez C. [et al] Anti-nuclear antibodies, anti-DNA and C4 complement evolution in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis treated with TNF-alpha blockers. Clin. Exp. Rheumatol. 2008; 26(3): 401-407.
3. Кундер Е.В. Дезоксирибонуклеазная активность иммуноглобулинов и сывороток крови при спондилоартропатиях. Украинский ревматологический журнал. 2010; 1: 6–12.
4. Кундер Е.В. Критерии дифференциальной диагностики спондилоартропатий на основе определения ДНКазной и гиалуронидазной активности сыворотки крови. Здравоохранение. 2008; 2: 56–59.
5. Idanpaan-Heikkila J.E. Ethical principles for the guidance of physicians in medical research – the Declaration of Helsinki. Bulletin of the World Health Organisation. 2001; 79: 279.
6. Van der Linder S., Valkenburg H.A., Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis: a proposal for modification of the New York criteria. Arthritis Rheum. 1984; 27: 361–368.
7. Генералова А.Г., Генералов И.И. Оценка ДНКазной активности методом риванолового сгустка. Клини. лаб. диагн. 1997; 11: 33–34.
8. Азаренок К.С., Генералов И.И., Голубева А.Г. [и соавт.] Способ определения ДНКазной активности : пат. 243А Респ. Беларусь, МПК С12 Q1/34, С 12 N 9/22; заявитель Витебск. гос. мед. инст-т. – заявл. 06.04.93; опубл. 14.03.96. Афіцыйны бюл. Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. 1996; 3: 174.
9. Peluso R., Di Minno M.N., Iervolino S. [et al] Enteropathic spondyloarthritis: from diagnosis to treatment. Clin. Dev. Immunol. 2013; 631408 DOI:10.1155/2013/631408.
10. Harris J. Autophagy and cytokines. Cytokine. 2011; 56: 140-146.
11. Van Praet L., Van der Bosch F.E., Jacques P. [et al] Microscopic gut inflammation in axial spondyloarthritis: a multiparametric predictive model. Ann Rheum Dis. 2013; 72(3): 414-417.
12. Branzk N., Papayannopoulos V. Molecular mechanisms regulating NETosis in infection and disease. Semin. Immunopathol. 2013; 35(4): 513-530 DOI:10.1007/s00281-013-0384-6.
13. Remijsen Q., Kuijpers T.W., Wirawan E. [et al] Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. Cell Death Differ. 2011; 18(4): 581-588 DOI:10.1038/cdd.2011.1.
14. Еременко А.М. Лекарственная волчанка в практике терапевта. Вестник молодого ученого. Ставропольский государственный медицинский университет. 2013; 4: 42-45.
15. Rubin R.L. Drug-induced lupus. Expert Opin. Drug Saf. 2015; 14(3): 361-378 DOI:10.1517/14740338.2015.995089.
16. Laukova L., Konecna C., Babickova J. [et al] Exogenous deoxyribonuclease has a protective effect in a mouse model of sepsis. Biomed. Pharmacother. 2017; 93: 8-16 DOI:10.1016/j.biopha.2017.06.009.
17. Gaianan D. Katkar., Sundaram M.S., NaveenKumar S.K. [et al] NETosis and lack of DNase activity are key factors in Echis carinatus venom-induced tissue destruction. Nat. Commun. 2016; 7: 11361 DOI:10.1038/ncomms11361.

Сведения об авторах:

Петрович Дмитрий Михайлович - соискатель кафедры кардиологии и ревматологии БелМАПО, dr.bio@rambler.ru.

Кундер Елена Владимировна - профессор кафедры кардиологии и ревматологии БелМАПО, д.м.н., профессор, elsid7@mail.ru, 80296778220.

Поступила 18.10.2018 г.