

616-018-097:576.8.097.5:616-078

## DETEKCE ORGÁNOVĚ NESPECIFICKÝCH AUTOPROTILÁTEK A JEJICH VÝZNAM V DIAGNOSTICE SYSTÉMOVÝCH ONEMOCNĚNÍ POJIVA

Kpt. MUDr. Miroslav PRŮCHA, pplk. MUDr. Přemysl RÁKOSNÍK

Oddělení klinické a experimentální imunologie Vojenského ústavu hygieny, epidemiologie a mikrobiologie, Praha  
(náčelník: plk. MUDr. Vladimír Kotlář, CSc.)

Vyšetření na přítomnost antinukleárních protilátek (ANA) se stalo jednou ze široce používaných metod v diagnostice autoimunitních onemocnění. V bulletinu WHO z roku 1981 byly stanoveny racionální indikace osmi používaných diagnostických metod v klinické imunologii včetně vyšetření ANA. Jako nezbytné bylo vyšetření uznáno při diagnóze systémového lupus erythematos (SLE), s určením výše titru protilátek a jeho monitorováním při terapii. Jako pomocné pro diagnózu Sharpův sy (mixed connective tissue disease – MCTD), autoimunitní formy chronické aktivní hepatitidy, léky indukovaného LE a progresivní systémové sklerózy.

Velkou skupinu autoimunitních chorob představují tzv. systémová onemocnění pojiva – kolagenózy. V následujícím přehledu bychom chtěli podat informace o významu detekce některých orgánově nespecifických autoprotilátek v diferenciální diagnostice těchto onemocnění.

### Způsoby detekce

Detekci ANA lze provádět mnoha způsoby. Vedle imunodifúze, hemaglutinace, protisměrné imuno-elektroforézy, radioimunostanovení (RIA) nebo enzymoimunostanovení (ELISA) zůstává v našich podmínkách nejvíce využívanou metoda nepřímé imuno-fluorescence (NIF). ANA se detekují na zmražených mikrotomových řezech zvířecích tkání – myších ledvin nebo krysích jater. Rovněž je možné ANA zjišťovat na jádrech buněčných kultur Hep-2 buněk nebo lidských leukocytů. Při NIF jsou séra pacientů nanášena na uvedený substrát a po navázání se detekují použitím fluorescenčních antiglobulinových konjugátů značených fluoroisothiocyanátem (FITC).

### ANA ve zdravé populaci

Je známou skutečností, že nález ANA neznamená ještě autoimunitní onemocnění. Pozitivní nález nízkého titru ANA v populaci do 50 let se udává ve 4 %, nad 65 let v 18 % (1). Výskyt ANA u žen je přitom vyšší než u mužů.

### Systémová onemocnění pojiva

Průkaz ANA je důležitým diagnostickým kritériem autoimunitních chorob. Systémový LE, revmatoidní artritida (RA), sklerodermie, MCTD, systémová skleróza jsou onemocnění s aberacemi v humorální

i buňkami zprostředkované imunitě. Výsledkem těchto dysregulací je vznik různých druhů autoprotilátek. Pro některé formy kolagenóz je podstatným imunologickým nálezem přítomnost ANA. Podobně jako LE fenomén, který je zjišťován v přítomnosti protilátek proti deoxyribonukleoproteinu (DNP), jsou ANA namířeny proti různým jaderným antigenům. V literatuře jsou rozlišovány různé typy fluorescence uváděné s korelacemi k některým nosologickým jednotkám (tab. 1). V tabulce 2 je udána pozitivita výskytu ANA u jednotlivých chorob. Uvádí se, že v systému bílkovin buněčného jádra se nalézá asi 1500 antigenů. Některé z nich jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 1

ANA u systémových onemocnění

| Typ fluorescence | Antigen                          | Onemocnění                                                                  |
|------------------|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| Homogenní        | ds-DNA<br>Histony<br>DNP         | SLE<br>Diskoidní LE<br>Sjögrenův sy<br>MCTD<br>Dermato-Polymyositida<br>PSS |
| Periferní        | ds-DNA<br>ss-DNA                 | SLE aktivní<br>jiná onemocnění než SLE                                      |
| Skvrnitý         | Sm                               | SLE<br>PSS<br>Dermato-Polymyositida<br>Revmatoidní artritida                |
|                  | ENA<br>n RNP                     | MCTD<br>Dermato-Polymyositida<br>PSS                                        |
| Nukleolární      | nedostatečně<br>charakterizováno | PSS<br>Sjögrenův sy                                                         |

Tabulka 2

Výskyt ANA při autoimunitních onemocněních

| Diagnóza                       | Pozitivita ANA (%) |
|--------------------------------|--------------------|
| Systémový LE                   | 95–100             |
| Revmatoidní artritida          | 40–60              |
| Progresivní systémová skleróza | 60–90              |
| Polymyositida-dermatomyositida | 49–74              |
| MCTD (Sharpův sy)              | 100                |
| Sjögrenův sy                   | 80                 |

Tabulka 3

**Komplexy antigen – protilátka detekované v buněčném jádru**

|                                                  |
|--------------------------------------------------|
| DNA                                              |
| ds-DNA                                           |
| ss-DNA                                           |
| Histony                                          |
| H1, H2A, H3, H4                                  |
| histonové komplexy                               |
| Nehistonové proteiny                             |
| Sm, RNP, Ro/SSA, La/SSB, KiRANA, PM-1, Jo-1, Ku, |
| Scl-70, centromera, nukleolární antigeny         |

Med. Clin. N. Amer., 69, 1985, č. 3

**Charakterizace systémů antigen-protilátka**

Významné postavení v diagnostice autoimunitních chorob mají protilátky proti dvouvláknové deoxyribonukleové kyselině, anti-ds-DNA. Jejich pozitivita vysoce koreluje s klinickým obrazem SLE, obvykle ve vysokých titrech (2). Jejich průkaz se provádí NIF na prvku Trypanozoma Danilewski, jehož kinetoplast je zdrojem nativní dvouvláknové DNA.

Histony jsou nukleoproteiny přítomné v eukaryotických buňkách tvořící podstatnou část chromatinu. Při přítomnosti autoprotiálků proti histonům jsou zjišťovány různé typy imunofluorescence (3). Na základě vysycovacích pokusů bylo přijato, že protilátky, které vážou nukleoprotein, jsou protilátky proti histon-DNA komplexům a jejich specifita je ekvivalentní LE-buňkám.

V sérech pacientů se systémovým onemocněním pojiiva jsou zjišťovány protilátky proti tzv. extrahovatelným nukleárním antigenům (ENA). Nomenklatura těchto antigenů vychází ze jmen pacientů, u kterých byly poprvé protilátky prokázány. Jsou dobře biochemicky definované a nejdůležitějšími z nich jsou Sm, Ro-SSA, La-SSB, Scl-70, Ma antigen (4). První metodou jejich průkazu byla Ouchterlonyho precipitace. V současné době je možné tyto protilátky detekovat imunofluorescenčně, ELISA a RIA metodou.

**SLE**

Jedním z nejzávažnějších autoimunitních onemocnění postihujících různé systémy je systémový LE. Symptomatologie s laboratorními ukazateli představuje základ pro diagnostická kritéria Americké revmatologické společnosti (5). Zvláště závažné je postižení ledvin, srdce, plic, CNS. V patogenezi se uplatňuje 3. typ přecitlivělosti (imunokomplexový). Výskyt autoprotiálků proti ds-DNA je patognomický pro stanovení diagnózy. Jsou detekovatelné u 50 až 75 % pacientů v závislosti na použité metodě a aktivitě onemocnění (6). Při současném poklesu C3 je udávána prakticky 100% specifita a senzitivita u pacientů s klinickým obrazem SLE (1). Nízký titr anti-ds-DNA je zjišťován při RA (7), chronické ak-

tivní hepatitidě (8), léky indukovaného lupusu (9), psoriatické artritidě, sekundární a idiopatické uveitidě a některých infekčních onemocnění. Pozitivní korelace byla nalezena mezi přítomností komplement vázajících anti-ds-DNA a aktivitou onemocnění při postižení ledvin. S výskytem protiálků proti ds-DNA souvisí i přítomnost ve svých důsledcích patologických imunokomplexů uplatňujících se při orgánovém postižení. Nejzávažnější průběh mívá onemocnění při výskytu anti-ds-DNA ve třídě IgG, zatímco při výskytu ve třídě IgM bývá průběh mírnější s relativně benigními změnami na ledvinách (12, 13). Protilátky proti jednovláknové DNA se kromě SLE vyskytují u celé řady jiných autoimunitních, maligních a infekčních onemocnění (10, 11). Z dalších autoprotiálků je možno nalézt u nemocných se SLE protilátky proti komplexu ENA-anti-Ro/SSA, anti-La/SSB, Sm, histonu a dalším. Podle výskytu jednotlivých druhů protiálků je možné usuzovat na klinický průběh a prognózu onemocnění (15, 16).

V souvislosti s výskytem autoprotiálků u SLE je nutné se zmínit o tzv. ANA-negativním SLE. Jedná se o skupinu pacientů, v jejichž sérech nebyly opakovaně prokázány protilátky anti-DNA ani proti jiným cytoplazmatickým antigenům, ačkoli klinický obraz a další sérologická diagnostika byly charakteristické pro SLE (17, 18, 19). Charakteristické je pro tuto skupinu postižení kůže ve formě rashe, mukózních vředů a fotosenzitivita. Udává se 5% výskyt ANA-negativních pacientů se SLE na jednom z následujících tří substrátů – myši ledvina, krysí játra, lidské granulocyty. Jedno z vysvětlení vychází z nemožnosti detekovat anti-Ro a anti-La protilátky na uvedených substrátech. Jiné hypotézy uvažují o fenoménu prozóny při průkazu protiálků nebo „ukrytí“ protiálků v imunitních komplexech (20).

**Lékově indukovaný lupus erytematodes**

Podávání některých léků jako hydralazinu, isoniazidu, procainamidu, chlorpromazinu, hydantoinových derivátů, beta blokátorů nebo antithyroidálních léků může vyvolat obraz onemocnění podobný SLE. Více postiženy jsou ženy (21). Klinický obraz obou onemocnění se liší, charakteristickým nálezem v autoprotiálkách je přítomnost antihistonových protiálků (22), zatímco protilátky anti-Sm a anti-DNA obvykle nejsou přítomny.

**Sjögrenův syndrom**

Triáda – suché oči (keratoconjunctivitis sicca), suchá ústa (xerostomie) a onemocnění pojivové tkáně charakterizuje toto onemocnění. Slinné a slzné žlázy jsou infiltrovány lymfoplazmocelulárními buňkami. Prakticky ve 100 % je pozitivní RF latexfixačním testu, jehož průkaz je možný také místně v synovii nebo ve slinách. Vysoký titr kryoglobulinů nebo cirkulujících

cích IgG-RF-IgG komplexů může vést k hyperviskóznímu syndromu. Z ANA se detekují protilátky proti některým cytoplazmatickým antigenům anti-Ro/SSA a anti-La/SSB. Protilátky anti-Ro a anti-La byly pravděpodobně poprvé detekovány v sérech pacientů se Sjögrenovým sy v roce 1958. Antigeny byly získány preparací z lidské a hovězí sleziny, buněčné linie Wil 2. Nejvíce využívanou a senzitivní metodou detekce se stalo enzymo a radioimunostanovení. Je možné použít metody Western-blottingu, ale bez kvantitativního vyjádření. Práce Alsopouha aj. popisovaly nálezy těchto protilátek výlučně u primárního Sjögrenova sy (23). Další autoři ale zjistili anti-Ro protilátky u pacientů s primárním i sekundárním Sjögrenovým sy a SLE (24) nebo sklerodermií (25). Anti-Ro protilátky byly také prokázány u pacientů s primární biliární cirhózou. Zvláštní pozornost si tyto protilátky zaslouží u matek se SLE, resp. novorozenců těchto matek. U nich je zvýšené riziko novorozeneckého LE. Protilátky anti-Ro jsou schopny transplacentárního přestupu. Pozoruhodné je zjištění, že séra s anti-La protilátkami precipitují RNA-proteiny asociované s adenoviry a EBV.

### Polymyositida-dermatomyositida

Diagnóza komplexu polymyositida-dermatomyositida vychází z kritérií Bohana a Petera z r. 1975 (26). Onemocnění je charakterizováno nehnisavým zánětem kosterních svalů a infiltrací lymfocyty. Diagnostický přínos průkazu protilátek není u tohoto onemocnění podstatný. Byly detekovány protilátky proti extrahovatelným nukleárním antigenům Mi-1 a Jo-1 (27, 28). Později byly nalezeny protilátky proti dalšímu antigenu z komplexu ENA-PM-1. Při použití NIF na linii Hep-2 buněk jsou nalézány protilátky proti jádru, jadérku i cytoplazmatickým komponentům.

### Progresivní systémová skleróza (PSS)

Název odpovídá termínům systémová sklerodermie nebo systémová skleróza. Průkaz autoprotiátek má pro stanovení diagnózy a prognózu onemocnění značný význam. ANA jsou prokazatelné již v časně fázi onemocnění. Typické jsou antinukleolární protilátky proti 4-6S-RNA a 7-2-ribonukleoproteinu. Nukleolární protilátky se ale mohou vyskytovat i u SLE, chronické polyartrity a Sjögrenova sy (29). Specifické pro PSS jsou anticentromerové protilátky (ACA) a protilátky proti antigenu Scl-70. Pacienti s těmito protilátkami častěji vykazují těžké formy onemocnění s postižením více orgánů, zejména plic. ACA jsou také prokazovány u CREST syndromu (kalcinóza, Raynaudův syndrom, stenóza ezofagu, sklerodaktylie, teleangiektázie). Proto pozitivní nález ACA u pacientů s Raynaudovým sy by měl vést v diagnostické rozvaze také k PSS.

### Sharpův syndrom – MCTD (mixed connective tissue disease)

MCTD bylo původně popsáno jako „pravděpodobně diskretní syndrom revmatického onemocnění sdružený s výskytem specifických protilátek proti ENA“ (30). V klinickém obraze jsou typické artralgie, Raynaudův fenomén, artritida, poruchy motility jícnu, myositida, sklerodaktylie. V porovnání s jinými systémovými onemocněními má lepší prognózu, mírnější průběh, jen výjimečně s postižením ledvin, a dobře reaguje na kortikoidní terapii. Z autoprotiátek jsou nejtypičtější protilátky proti ribonukleoproteinovému komplexu U1 RNP. Pro diagnózu je specifický titr větší než 1 : 1600 při hemaglutinační metodě. Specifita těchto protilátek k diagnóze MCTD se uvádí 99 % (31).

Stanovení specifických antinukleárních protilátek má důležité místo v diagnostice, monitorování průběhu a prognóze autoimunitních onemocnění. Metoda NIF slouží dnes jako screeningová metoda s poměrně dobrou reprodukovatelností. Vedle této metody se stále ve větší míře uplatňují metody ELISA a RIA. Při charakterizaci antigenů hraje nezastupitelnou roli westernblotová technika. Dá se očekávat, že další podrobnější charakterizace antigenů a autoprotiátek, podmínek jejich vzniku by mohly přispět k objasnění otázek patogeneze i terapie tak závažných onemocnění, jakými jsou systémová onemocnění pojiva.

### Souhrn

Výskyt antinukleárních protilátek je jedním ze základních diagnostických znaků systémového onemocnění pojiva. Tyto autoprotiátky se přímo účastní v patogenezi těchto onemocnění. Autoři ve svém sdělení předkládají základní informace o způsobech detekce antinukleárních protilátek, jejich nomenklatuře a významu v diagnostice systémových onemocnění pojiva.

### Literatura

1. GOODWIN, J. S. – HARLES, R. D. – TUNG, K. S. K.: Immunological responses of a healthy elderly population. Clin. Exp. Immunol., 1982, 48, s. 403–410.
2. WEINSTEIN, A. et al.: Antibodies to native DNA and serum complement (C3) levels. Am. J. Med., 1983, 74, s. 206.
3. TAN, E. M.: Relationship of nuclear staining patterns with precipitating antibodies in systemic lupus erythematosus. J. Lab. Clin. Med., 1987, 70, s. 800.
4. MOORE, T. L.: Extractable nuclear antigens. Semin. Arthritis Rheum., 1981, 10, s. 309.
5. TAN, E. M.: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheumat., 1982, 25, s. 1271.
6. STOLLAR, B. D.: Anti-DNA antibodies. Clin. Immunol. Allergy, 1981, 1, s. 243.
7. ROCHMIS, P. G. et al.: Native DNA binding in rheumatoid arthritis. Ann. Rheum. Dis., 1974, 33, s. 357.

8. KARSH, J. et al.: Anti DNA, anti-deoxyribonucleoprotein and rheumatoid factor measured by ELISA in patients with SLE. Sjögren's sy and rheumatoid arthritis. *Int. Arch. Appl. Immunol.*, 1982, 68, s. 60.
9. KALLENBERG, C. G. M. et al.: Antinuclear and antinative DNA antibodies during captopril treatment. *Acta Med. Scand.*, 1982, 211, s. 297.
10. IZNI, S. et al.: The occurrence of antibodies against ss-DNA in the sera of patients with acute and chronic leukemia. *Clin. Exp. Immunol.*, 1976, 24, s. 379.
11. VILLEREJOS, V. M. et al.: Antibodies to ss-DNA: A diagnostic aid in chronic hepatitis B virus infection. *J. Med. Virol.*, 1979, 4, s. 97.
12. PENNEBAKER, J. B. – GILLIAM, J. N. – ZIFF, M.: Immunoglobulin classes of DNA binding activity in serum and skin in SLE. *J. Clin. Invest.*, 1977, 60, s. 1331.
13. CLOUGH, J. D. – VALENZUELA, R.: Relationship of renal histopathology in SLE nephritis to immunoglobulin class of anti-DNA. *Am. J. Med.*, 1980, 68, s. 80.
14. WASICEK, C. A. – REICHLIN, M.: Clinical and serological differences between systemic lupus erythematosus patients with antibodies to Ro versus patients with antibody to Ro and La. *J. Clin. Invest.*, 1982, 69, s. 835.
15. KLAJMAN, A. et al.: The prevalence of antibodies to histones induced by procainamide in old people, in cancer patients and in rheumatoid-like diseases. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1983, 27, s. 1.
16. FISHBEIN, E. – ALARCON-SEGOVIA, – VEGA, J. M.: Antibodies to histones in systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.*, 1979, 3, s. 145.
17. FESSEL, W. J.: ANA-negative systemic lupus erythematosus. *Am. J. Med.*, 1977, 64, s. 80.
18. GLADMAN, D. D. – CHALMERS, A. – UROWITZ, M. B.: Systemic lupus erythematosus with negative LE cells and antinuclear factor. *J. Rheumatol.*, 1978, 5, s. 142.
19. MADDISON, P. J. – PROVOST, T. T. – REICHLIN, M.: Serologic findings in patients with systemic lupus erythematosus who lack demonstrable antinuclear antibodies. *Clin. Research*, 1978, 26, s. 175.
20. BLOMJOUS, F. J. E. M. – FELTKEMP-VROOM, T. M.: Hidden antinuclear antibodies in seronegative systemic lupus erythematosus patients and in NZB and F1 mice. *Eur. J. Immunol.*, 1971, 1, s. 396.
21. BATCHELOR, J. R. et al.: Hydralazin induced systemic lupus erythematosus: Influence of HLA-DR and sex on susceptibility. *Lancet*, 1980, 1, s. 1107.
22. PORTANOVA, J. P. et al.: Reactivity of anti-histone antibodies induced by procainamide and hydralazine. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1982, 25, s. 67.
23. ALSPOUGH, M. A. – TATAL, N. – TAM, E. M.: Differentiation and characterization of autoantibodies and their antigens in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.*, 1976, 19, s. 216.
24. ALEXANDER, E. L. et al.: Ro/SSA and La/SSB antibodies in the clinical spectrum of Sjögren's syndrome. *J. Rheumatol.*, 1982, 9, s. 239.
25. OSIAL, T. A. et al.: Antibodies to SSA, SSB and RANA in progressive systemic sclerosis (PSS) with and without Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.*, 1982, 25, s. 34.
26. BOHAN, A. – PETER, J. B.: Polymyositis and dermatomyositis. *N. Engl. J. Med.*, 1975, s. 344.
27. NISHIKAI, M. – REICHLIN, M.: Purification and characterization of a nuclear non-histone basic protein (Mi-1) which reacts with anti-immunoglobulin sera and the sera of patients with dermatomyositis. *Molec. Immunol.*, 1980, 17, s. 1129.
28. NISHIKAI, M. – REICHLIN, M.: Heterogeneity of precipitating antibodies in polymyositis: characterization of the Jo-1 antibody system. *Arthritis Rheum.*, 1980, 23, s. 881.
29. REICHLIN, M.: Antibodies to a nuclear/nucleolar antigen in patients with polymyositis-overlap syndromes. *J. Clin. Immunol.*, 1984, 4, s. 40.
30. SHARP, G. C.: Mixed connective tissue disease: an apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigens (ENA). *Am. J. Med.*, 1972, 52, s. 148.
31. KASUKAMA, R.: Preliminary diagnostic criteria for classification of MCTD. In: *Mixed connective tissue disease and antinuclear antibodies*. Elsevier Science Publ. B. U., Ed: R. Kasukawa and G. C. Sharp, 1987.

Klíčová slova: Autoprotilátky; Detekce; Systémová onemocnění pojiva; Diagnostika.