УДК 616.5–002.525.2–039.54–097

В.В. Чоп'як
Я.Ф. Толстяк

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

Ключові слова: *аутоантитіла, кореляція, системний червоний вовчак, SLEDAI, BILAG.*

ОСОБЛИВОСТІ ВЗАЄМОЗВ'ЯЗКІВ АУТОАНТИТІЛ ДО ЕКСТРАГОВАНИХ ЯДЕРНИХ АНТИГЕНІВ ТА СКРИНІНГОВИХ АУТОАНТИТІЛ У ХВОРИХ НА СИСТЕМНИЙ ЧЕРВОНИЙ ВОВЧАК

Системний червоний вовчак (СЧВ) характеризується утворенням низки аутоантитіл. Одні аутоантитіла є скринінговими (ANA та anti-dsDNA), інші — підтверджуючими (ENA). Мета. Вивчити взаємозв'язки аутоантитіл до ENA зі скринінговими аутоантитілами у пацієнтів із СЧВ. Об'єкт і методи. За ретроспективними і поточними лабораторними даними відібрано для аналізу 105 хворих на СЧВ, які відповідали критеріям класифікації ACR (1997). Серологічні тести включали визначення ANA, anti-dsDNA, anti-Sm, anti-RNP, anti-Ro, anti-La за допомогою імуноферментного аналізу. Результати та їх обговорення. Позитивні скринінгові ANA зареєстровано у 85 (81,0%) хворих. Підвищений рівень anti-dsDNA виявлено в 91 (86,6%) пацієнта. Позитивний титр антитіл до RNP зафіксовано у 18 (32,2%) обстежених, у 23 (51,0%) пацієнтів — підвищений титр anti-SS-A і у 25 (50,0%) — anti-SS-B. Антитіла до Sm виявлено у 18 (30,0%) пацієнтів. При використанні регресійного аналізу та коефіцієнта кореляції Пірсона позитивні кореляції відмічено між значеннями anti-RNP і SLEDAI ($r=0,57$; $p<0,05$), anti-RNP і BILAG ($r=0,60$; $p<0,05$). Висновок. У наведеній роботі показано, що дослідження титрів антитіл до екстрагованих ядерних антигенів при СЧВ має важливе значення не лише для діагностики та активності захворювання, але і для прогнозування розвитку ускладнень СЧВ.

ВСТУП

Антиядерні антитіла (antinuclear antibody — ANA) є основними діагностичними маркерами системного червоного вовчака (СЧВ), оскільки при цьому захворюванні їх виявляються у 95% пацієнтів. Скринінгові тести при СЧВ — це виявлення ANA та антитіл до двоспіральної дезоксирибонуклеїнової кислоти (antibodies to double-stranded deoxyribonucleic acid — anti-dsDNA). Для остаточного встановлення діагнозу використовують підтверджуючі тести, основою яких є аутоантитіла до екстрагованих ядерних антигенів (autoantibodies to extracted nuclear antigens — anti-ENA), які складаються із комплексів розчинних рибонуклеопротеїнів. Anti-ENA часто виникають до двох груп мішеней: 1) специфічного рибонуклеїнового комплексу (RNP) — Ro/La частинок; 2) U1RNP-комплексу. U1RNP-комплекс (антитіла до білкових компонентів U1 малого ядерного рибонуклеопротеїду — U1RNA) — це більший компонент сплайсосоми, котрий каталізує pre-miRNA (клас RNA, при розчепленні якого на дві частини з однієї утворюється miRNA) [9]. Для цього комплексу характерна присутність аутоантигенів, що складаються з RNP білків (RNP70, RNP A, RNP B, RNP C) та Sm-антигену, названого на честь хворого Smith, у якого він був вперше виявлений; цей антиген складається із п'яти малих ядерних RNA (U1, U2, U4, U5, U6), асоційованих з ⩾11 поліпептидів (A′, B′/B′, C, D, E, F, G) [10]. Ro/La комплекс складається з чотирьох малих уридин-збагачених, цитоплазматичних RNA частинок (hYRNA) та декількох асоційованих протеїнів Ro60, Ro52, La/SS-B. Обидва Ro60 та La/SS-B антигени володіють RNA-зв'язуючими властивостями; вони можуть зв'язувати RNA як напряму, так і опосередковано через асоціацію з Ro52 [5, 10]. Anti-Sm, anti-RNP, anti-Ro/La антитіла асоціюють із СЧВ, відповідно з частотою 20–30; 30–40 та 40% випадків. Незважаючи на чіткі клінічні асоціації з екстрагованими ядерними аутоантигенами (ENA), необхідно врахувати, що anti-ENA ефективніші для діагностики СЧВ, а не для оцінки активності хвороби чи пошкодження органів [4]. Варто зазначити, що частота

anti-Sm у хворих на СЧВ коливається залежно від етнічної групи: від 10% у кавказьких народів (грузини, вірмени, азербайджанці, осетини, абхазці) до 35–40% у європейців [12]. У пацієнтів із СЧВ, в яких дебют хвороби припав на вік старше 50 років, відзначають нижчу частоту anti-RNP та Sm-антигену порівняно з хворими на СЧВ, маніфестація якого почалася у молодому віці [6]. За даними когортного дослідження СЧВ, високі рівні anti-Ro, anti-La спостерігалися у хворих на СЧВ з ураженням нервової системи [7]. E. Ahlin та співавтори (2012) визначили, що група антитіл до RNA (anti-RNP/Sm, anti-Sm, anti-SS-A/Ro60, anti-SS-A/Ro52, anti-SS-B/La) частіше входять до складу циркулюючих імунних комплексів, ніж DNA-асоційовані (anti-dsDNA, антигістонові, антинуклеосомні) або цитоплазматичні (антирибосомні P) антитіла [5].

Мета роботи — вивчити взаємозв'язки аутоантитіл anti-ENA зі скринінговими аутоантитілами у пацієнтів із СЧВ.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Проаналізовано результати обстеження 105 хворих на СЧВ віком від 17 до 68 років (у середньому — 34±0,8 року). Серед цих пацієнтів були 14 (13,3%) чоловіків та 91 (86,7%) жінка. Тривалість маніфестації хвороби становила 5±0,5 року. Гострий перебіг патологічного процесу був у 7 (6,6%), підгострий — у 23 (21,9%), хронічний — у 75 (71,5%) хворих. Мінімальний ступінь активності хвороби був у 17 (16,2%) пацієнтів, помірний — у 65 (61,9%), високий — у 23 (21,9%).

Визначення anti-dsDNA. Кількісне визначення аутоантитіл класу IgG до двоспіральної ДНК (dsDNA) проводили методом хемілюмінесцентного імуноаналізу (CLIA) за допомогою аналізатора LIAISON®. Для дослідження використовували тест-системи фірми «DiaSorin» (Італія) [5, 6].

Синтетична dsDNA зв'язана з магнітними мікрочастинками, мишачі моноклональні антитіла до людського IgG мічені похідними ізолюмінолу (кон'югат антитіл з барвником). Під час першої інкубації антитіла до dsDNA, присутні у калібраторах, контролях та пробах, зв'язуються з твердою фазою. Під час другої інкубації кон'югат взаємодіє з IgG до dsDNA, вже фіксованим на твердій фазі. Після кожної інкубації незв'язані молекули видаляються під час циклу промивання. Потім до реакційної суміші додавали реактиви для активації, котрі індукують хемілюмінесцентну реакцію. Інтенсивність люмінесценції вимірювали за допомогою фотоприскорювача у відносних одиницях інтенсивності, що відображає концентрацію anti-dsDNA (IgG) в калібраторах, контролях і пробах пацієнтів у МО/мл. Вимірювальний діапазон 0,5–340 МО/мл. Норма — менше 25 МО/мл.

Визначення титру ANA. Для дослідження титру ANA використовували метод непрямої радіоімунофлюоресценції в оригінальній модифікації з використанням як субстрату клітин лінії аденокарциноми гортані людини HEp-2. Результат досліджували за допомогою люмінесцентного мікроскопа. Для дослідження використовували реактиви фірми «ImmunoConcepts» (США) [1].

У лунки з моношаром культури клітин HEp-2 вносили сироватку хворих у розведенні 1:80. Відмивання проводили у фосфатно-сольовому буфері (ФСБ) впродовж 10 хв. Для виявлення утворених імунних комплексів використовували 30-хвилинну інкубацію сироваткою кроля проти IgG людини, міченої флюоресцеїнізотіоціанатом. Після відмивки ФСБ впродовж 10 хв зрізи переміщували в гліцерин, забуферений ФСБ (10:1; pH 8,2). При виявленні у хворого ANA описували тип світіння та визначали кінцевий титр антитіл. Для стандартизації цього методу використовували референтну сироватку ВООЗ AF/CDC1, котра містить 100 МО/мл з гомогенним типом ядра, що відповідає нормі розведення сироватки до 1:160.

Визначення ANA-скринінгу. Для проведення скринінгового кількісного визначення ANA методом імуноферментного аналізу (ІФА) використовували реактиви фірми «ORGENTEC» (Німеччина). Для дослідження використовували тест-системи фірми «DiaSorin» (Італія). Цей метод загалом визначає ANA й антитіла проти SS-A/Ro, SS-B/La, RNP/Sm [6].

Ці очищені антигени додані в мікролунки. Антитіла проти цих антигенів присутні у сироватці та плазмі крові та зв'язуються у наявних зразках із відповідними антигенами. При промиванні були видалені незв'язані компоненти сироватки. Розчин кон'югантів людського IgG з пероксидазою хрону додавали в лунки для визначення аутоантитіл, зв'язаних з іммобілізованими антигенами. Дослідження відкалібровано згідно з міжнародними значеннями сироваток CDC (Атланта, США), крім того, ВООЗ для anti-DNA Wo/80. Інтерпретація результатів ANA-скринінгу: ANA — норма менше 1,0; норма рівня ENA — SS-A/Ro, SS-B/La, RNP/Sm — до 20 МО/мл.

Статистичну обробку матеріалу проводили з використанням пакета прикладних програм (MS Excel, SPSS), які визначали аналіз регресії та коефіцієнт кореляції Пірсона.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Проведено оцінку активності та тяжкості перебігу згідно з міжнародними індексами SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index): немає активності — 0 балів; низька активність — 1–5 балів — 13 (12,4%); середня активність — 6–11 балів — 44 (41,9%); висока активність — 11–19 балів — 36 (34,3%); дуже висока активність — >20 балів — 12 (11,3%) хворих; та BILAG-2004 (British Isles Lupus Assessment Group): A — найбільш тяжкий ступінь активності — 20 (19,1%); B — проміжний ступінь активності — 72 (68,6%); C — легкий ступінь активності — 13 (12,4%) хворих.

ANA відповідно виявлено у 81,0% випадків, anti-dsDNA — у 86,6% хворих. Антитіла до екстрагованих ядерних антигенів визначали: anti-SS-A — у 45 хворих, з яких позитивні результати одер-

жано у 23 (51,0%) обстежених; anti-SS-B — у 50, із них у 25 (50,0%) позитивні результати; anti-Ro-52 — у 38 хворих, із них 14 (36,8%) позитивні; anti-Sm — у 60, із них позитивні у 18 (30,0%), anti-PNP визначали у 56 пацієнтів, із них позитивні результати отримано у 18 (32,2%) хворих, що показано у табл. 1. Значущість визначення цих антитіл показана у дослідженні E. Cozzani та співавторів у 2014 р. [8].

Таблиця 1

Аутоантитіла у хворих на СЧВ (ІФА)

Вид аутоантитіл	Кількість обстежених	Результат	
		Позитивний, n (%)	Негативний, n (%)
dsDNA	105	91 (86,6)	14 (13,4)
ANA	105	85 (81,0)	20 (19,0)
Sm	60	18 (30,0)	42 (70,0)
RNP	56	18 (32,2)	11 (64,7)
SS-B	50	25 (50,0)	25 (50,0)
SS-A	45	23 (51,0)	22 (49,0)

Титри anti-RNP мали вірогідну сильну позитивну кореляційну залежність з anti-SS-A та anti-SS-B (r=0,99; p<0,01), як свідчать дані табл. 2. Найчастіше відмічали кореляцію ANA з іншими аутоантитілами при кількісному визначенні. Сильна позитивна кореляція ANA зафіксована з аутоантитілами до SS-A, SS-B та RNP, причому з аутоантитілами до SS-B вона була вірогідною (p<0,05). Подібні результати були показані у дослідженнях H.O. Yang та співавторів, котрі визначали великий епітоп anti-Sm з амінокислотною послідовністю пептидів D183–119 у дітей з СЧВ та проводили їхню кореляцію з іншими аутоантитілами. У зазначеній роботі показано вищу чутливість (78,3% *vs* 26,1%, χ^2=25,1, p<0,05) і незначно нижчу специфічність (90,8% *vs* 100%, χ^2=13,6, p<0,05), ніж anti-Sm. Подальший аналіз показав, що anti-SmD183–119 позитивно корелювали з anti-dsDNA, anti-RNP та антигістоновими антитілами при СЧВ у дітей [13].

Таблиця 2

Кореляція виявлених різних видів аутоантитіл у хворих на СЧВ

Антитіла	ANA-HEp-2	ANA (кількісно)	dsDNA	SS-A	SS-B	Sm	RNP
ANA-HEp-2	1,00	–	–0,50*	–	0,80	–0,27	–0,42
ANA (кількісно)	–	1,00	0,03	0,93	0,94*	0,47	0,94
dsDNA	–0,50*	0,03	1,00	–0,09	0,67	0,47*	0,72*
SS-A	–	0,93	–0,09	1,00	0,99	0,60	1,00*
SS-B	0,80	0,94*	0,67	0,99	1,00	0,43	1,00*
Sm	–0,27	0,47	0,47*	0,60	0,43	1,00	0,54*
RNP	–0,42	0,94	0,72*	0,99*	0,99*	0,54*	1,00

У табл. 2 і 3: *p<0,05 – вірогідність різниці показників.

Із використанням ІФА встановлено, що ANA, які визначали якісним методом, мали позитивну кореляцію середньої сили із anti-dsDNA (r=0,49), однак без вірогідної залежності (p>0,05). Титри anti-dsDNA мали сильну позитивну кореляцію (r=0,72) з anti-RNP (p<0,05) та позитивну кореляцію середньої сили з аутоантитілами до SS-B та Sm-антигенів, причому для антитіл до Sm-антигенів з вірогідною різницею (p<0,05).

Anti-ENA (SS-A, SS-B, Sm, RNP) мали позитивну кореляцію з іншими аутоантитілами та позитивно корелювали між собою. Як показано у табл. 2, anti-SS-A сильно корелювали з anti-SS-B та anti-RNP (r=0,99), вірогідно для anti-RNP (p<0,05). Anti-SS-B аналогічно корелювали з anti-SS-A та anti-RNP. Anti-RNP мали вірогідну (p<0,05) сильну позитивну кореляцію з SS-A та SS-B (r=0,99) і середньої сили позитивну кореляцію з аутоантитілами до Sm-антигену (r=0,54), також із вірогідною різницею (p<0,05). Anti-Sm мали позитивну кореляцію середньої сили зі всіма аутоантитілами, окрім ANA-HEp-2, причому з вірогідною залежністю з anti-dsDNA (r=0,47) та anti-RNP (p<0,05).

Встановлено кореляцію титру аутоантитіл з індексами активності SLEDAI та BILAG. Anti-RNP позитивно вірогідно (p<0,05) виражено корелювали із SLEDAI (r=0,57) та BILAG (r=0,60). Між собою ці індекси активності також мали вірогідну (p<0,05) сильну позитивну кореляцію (r=0,83), що свідчить про взаємозв'язок цих індексів (табл. 3).

Таблиця 3

Кореляція аутоантитіл з індексами активності в хворих на СЧВ

	SLEDAI	BILAG
ANA Hep-2	–0,02	0,14
ANA (кількісно)	0,04	–0,04
ANA (якісно)	–0,20	–0,02
dsDNA	–0,08	–0,17
SS-A	0,31	0,54
SS-B	–0,18	–0,07
Sm	–0,11	–0,01
RNP	0,57*	0,60*

Кореляція аутоантитіл до SS-A та SS-B з клінічними проявами СЧВ була продемонстрована у попередніх роботах авторів [3] і підтверджена у когортному дослідженні за участю 645 дітей із СЧВ, результати якого опубліковано у лютому 2017 р. [11].

ВИСНОВОК

Дослідження кореляції різних аутоантитіл у хворих на СЧВ показали, що найбільша позитивна кореляція спостерігалася між ANA (ІФА, кількісне визначення) та anti-RNP, anti-SS-A, anti-SS-B (r=0,94; p<0,05). Anti-dsDNA мали сильну позитивну кореляцію з anti-RNP (r=0,72; p<0,05) та середню позитивну кореляцію з Sm (r=0,47; p<0,05) та SS-B (r=0,67; p>0,05). Індекси активності SLEDAI (r=0,57; p<0,05) та BILAG (r=0,60; p<0,05) мали позитивну середньої сили кореляцію з anti-RNP. Вищенаведені результати демонструють позитивний діагностичний зв'язок між ANA та anti-dsDNA з anti-ENA (anti-RNP та anti-SS-A, anti-SS-B, anti-Sm). Активність захворювання була достовірно пов'язана тільки з anti-RNP.

Практичне значення отриманих результатів. На основі оцінки кореляції рівня anti-ENA (anti-RNP та anti-SS-A, anti-SS-B, anti-Sm) можна прогнозувати тяжкий перебіг у хворих на СЧВ і своєчасно призначити підвищені дози імуносупресивної та протизапальної терапії для запобігання ускладненням.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Ляпин С.В. (2010) Иммунологическая лабораторная диагностика аутоиммунных заболеваний. Пособие для врачей. СПб., 2010. 270 с.

2. Небильцова О.В. (ред.) (2011) Справочник по лабораторной диагностике. Доктор Медиа, Киев. 420 с.

3. Толстяк Я.Ф. (2013) Зв'язок аутоантитіл з клінічними проявами та індексами активності у хворих на системний червоний вовчак. XVII Міжнародний конгрес студентів та молодих вчених, Тернопіль, 22–24 квітня. С. 214.

4. Agarwal S., Harper J., Kiely P.D. (2009) Concentration of antibodies to extract able nuclear antigens and disease activity in systemic lupus erythematosus. Lupus, 18: 407–412.

5. Ahlin E., Mathsson L., Eloranta M.L. (2012) Autoantibodies associated with RNA are more enriched than anti-dsdNA antibodies in circulating immune complexes in SLE. Lupus, 21: 586–595.

6. Barland P., Lipstein E. (1996) Selection and use of laboratory testin therheumatic diseases. Am. J. Med., 100: 16–23.

7. Borowoy A.M., Pope J.E., Silveman E. (2012) Neuropsychiatric lupus: the prevalence and autoanibidy associations depend on the definition: results from the 1000 faces of lupus cohort. Semin. Arthritis Rheum., 15: 23–35.

8. Cozzani E., Drosera M., Gasparini G., Parodi A. (2011) Serology of lupus erythematosus: correlation between immunopathological features and clinical aspects. Autoimmune Dis., 2014: 321–359.

9. Meda F., Folci M., Baccarelli A. (2011) The epigenetics of autoimmunity. Cell. Mol. Immunol., 8: 226–236.

10. Migliorini S., Baldini C., Rocchi V., Bombardieri S. (2005) Anti-Sm та anti-RNP antibodies. Autoimmunity, 38: 47–54.

11. Novak G.V., Marques M., Balbi V. (2017) Anti-RO/SSA and anti-La/SSB antibodies: Association with mild lupus manifestations in 645 childhood-onset systemic lupus erythematosus. Autoimmun. Rev., 16: 132–135.

12. Sawalha A.H., Harley J.B. (2004) Antinuclear antibody in systemic lupus erythematosus. Curr. Opin. Rheumatol., 16: 534–540.

13. Yang H.O., Zhang XQ., Fu Q.H. (2016) Evaluating anti-SmD1-amino-acid 83–119 peptide reactivity in children with systemic lupus erythematosus and other immunological diseases. Chin. Med. J. (Engl.), 129: 2840–2844.

ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОСВЯЗЕЙ АУТОАНТИТЕЛ К ЭКСТРАГИРОВАННЫМ ЯДЕРНЫМ АНТИГЕНАМ И СКРИНИНГОВЫХ АУТОАНТИТЕЛ У БОЛЬНЫХ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ

В.В. Чопяк, Я.Ф. Толстяк

Резюме. *Системная красная волчанка (СКВ) характеризуется образованием ряда аутоантител. Одни аутоантитела являются скрининговыми (ANA и anti-dsDNA), другие — подтверждающими (ENA). Цель. Изучить взаимосвязь аутоантител экстрагированных ядерных антигенов со скрининговыми аутоантителами у пациентов с СКВ. Объект и методы. По ретроспективным и текущим лабораторным данным отобраны для анализа 105 пациентов с СКВ, которые отвечали критериям классификации ACR (1997). Серологические тесты включали определение ANA, anti-dsDNA, анти-Sm, anti-RNP, anti-Ro, anti-La с помощью иммуноферментного анализа. Результаты. Положительные антиядерные антитела (ANA) отмечены у 85 (81,0%) пациентов. Повышенный уровень anti-dsDNA выявлен у 91 (86,6%) больного. Положительный титр антител к RNP зафиксирован у 18 (32,2%) обследованных, у 23 (51,0%) пациентов — положительный титр anti-SS-A и у 25 (50,0%) — anti-SS-B. Антитела к Sm выявлены у 18 (30%) пациентов. При использовании регрессионного анализа и коэффициента корреляции Пирсона положительные корреляции оказались между значениями anti-RNP и SLEDAI (r=0,57, p<0,05), anti-RNP и BILAG (r=0,60, p<0,05). Вывод. В данной работе показано, что исследование титров антител к экстрагированным ядерным антигенам при СКВ имеет важное значение не только для оценки диагностики и активности заболевания, но и для прогнозирования развития осложнений СКВ.*

Ключевые слова: аутоантитела, корреляция, системная красная волчанка, SLEDAI, BILAG.

FEATURES OF INTERACTION OF AUTOANTIBODIES TO EXTRACTED NUCLEAR ANTIGENS AND SCREENING AUTOANTIBODIES IN PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

V.V. Chopyak, Y.F. Tolstiak

Summary. *Systemic lupus erythematosus (SLE) is characterized by multiple autoantibodies. Anti-double-stranded DNA (dsDNA) antibody titers may vary over time and after immunosuppressive treatment, while the behavior of anti-extractable nuclear antigen (ENA) over time is less well understood. Aim. The article describes results of researches of correlation of autoantibody ENA profile (anti-Ro, anti-La, anti-RNP, anti-Sm) with screening tests (ANA, anti-dsDNA) in patients with SLE. Materials and Methods. In the submitted study in 105 patients with SLE autoantibodies were evaluated and different subgroups of SLE were assessed. Associations of autoantibody activity of the disease expressed by the SLEDAI and BILAG (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index and British Isles Lupus Assessment Group). Serologic tests included ANA, anti-dsDNA, anti-Smith, anti-ribonucleoprotein (RNP), anti-Ro, anti-La immunoferment analysis. Results. Positive result of the antinuclear antibody (ANA) was found in 85 (81.0%) patients. A positive antibody titers to RNP was recorded in 18 (32.2%) patients, profile anti-DNA was found in 91 (86.6%) patients, 23 (51.0%) patient had titers anti-SS-A, and 25 (50.0%) patients had titers anti-SS-B. Antibody titers Sm were found in the group of 18 (30.0%) patients. Using regression analysis and Pearson's correlation coefficient correlations were found between anti-RNP values and SLEDAI (r=0.57, p<0.01), anti-RNP and BILAG (r=0.60, p<0.01). Conclusion. The study shows that evaluation of antinuclear antibody levels in SLE is important not only for the diagnosis establishment and its activity but also for prediction of development complication SLE.*

Key words: autoantibody, correlation, systemic lupus erythematosus, SLEDAI, BILAG.

Адреса для листування:
Толстяк Ярослав Федорович
79000, Львів, вул. Пекарська, 68
Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького
E-mail: tolstyakyaroslav@gmail.com