

УДК:616.5-004.1-097

## СПЕЦИФІЧНІСТЬ ТА ЧУТЛИВІСТЬ АУТОАНТИТІЛ У ХВОРИХ З РІЗНИМИ СУБ-ТИПАМИ СКЛЕРОДЕРМІЇ

ГАЄВСЬКА В.Ю., НАДАШКЕВИЧ О.Н., ГУТОР Т.Г.

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

При системній склеродермії (ССД) спонтанно продукуються аутоантитіла проти нуклеарних, нуклеолярних і мітохондріальних антигенів, які виявляються вже ранніх стадіях захворювання [2,3].

За допомогою тесту непрямой імунофлюоресценції, де як субстрат використовується культура тканин, флуорисцентні антикулеарні антитіла (ФАНА) визначаються у понад 90% хворих на ССД [5]. У високому відсотку хворих виявляються ці антитіла (АТ) у хворих на інші аутоімунні ревматичні захворювання (АРЗ), а також при деяких інфекційних та онкологічних захворюваннях. Визначення їх використовуються в основному в ролі скринінгового тесту для пошуку характерних для окремих нозологій антитіл до екстрагованих нуклеарних антигенів [1,3]. Відомо, що ФАНА виявляються більше, ніж у 5% здорових людей [4]. Застосовуються також і інші методи визначення антитіл антикулеарних антитіла (АНА): зустрічного імуноелектрофорезу, подвійної імунодифузії, імуноферментним, радіоімунопреципітації та імуноблотним [6]. Антигенами до цих антитіл є нуклеарні структури. За своєю природою антигени є макромолекулярними комплексами, що складаються з декількох поліпептидних ланцюгів або комбінації нуклеїнових кислот з протеїнами [8]. Так, склеродермічний антиген (СКЛ)-70 являє собою хроматиновий розчинний 70 КД нуклеарний протеїн, ідентифікований як топоізомераза-1 - фермент, що каталізує топологічну конверсію ДНК [11]. Центромери, як і СКЛ-70, належать до хроматинових антигенів і є протеїнами 17, 19, 50 і 140 КД, які локалізуються в центромерному регіоні хромосоми [7].

У провідних світових центрах з вивчення ССД вперше почалося дослідження аутоантитіл до низки недавно ідентифікованих при даній патології нуклеарних антигенів таких як: РНК-полімераза-I, -II, -III; Th-рибонуклеопротейд; РМ-1; U1, U3-рибонуклеопротейд (фібриларин); **Ro/SS-A; La/SS-B**.

Найбільш доказовими в плані верифікації діагнозу є наявність антицентромерних антитіл (АЦА) та антитіл до СКЛ-70 (АСКЛ-70). За різними літературними джерелами серед усіх хворих на ССД перші виявлялися в межах 15-51%, а другі - в межах 8-56%. Сьогодні проведено низку досліджень АСКЛ-70-А та АЦА при різних субтипах ССД [6,7].

За попередніми даними антитіла до антигену СКЛ-70 зв'язуються з ядерним ферментом ДНК-топоізомеразаю 1. Вони присутні в сироватці приблизно у 20% хворих на ССД; при дифузній формі системної склеродермії частота їх виявлення досягає 40%. У хворих з цими антитілами підвищений ризик пневмосклерозу і ураження інших внутрішніх органів.

Антитіла до центромер зв'язуються з білками кінетохора. Їх виявляють у 60 - 80% хворих з атеросклеротичною формою системної склеродермії (у тому числі з синдромом CREST) і лише у 10% хворих з дифузною формою.

Одночасно з антитілами до антигену СКЛ-70 їх виявляють рідко. Антитіла до РНК-полімеразам I, II і III, специфічні для ССД і виявляються у 20 - 30% хворих. Антитіла до РНК-полімераз I, II і III найчастіше виявляються у хворих з дифузною формою системної склеродермії і ураженням нирок і серця. Антитіла до Th-рибонуклеопротейдів присутні в сироватці хворих атеросклеротичною формою системної склеродермії, а антитіла до антигену РМ-1 з'являються при перехресному синдромі з ознаками поліміозиту і атеросклеротичної форми системної склеродермії. Антитіла до U3-рибонуклеопротейдів (фібриларину) високоспецифічні для системної склеродермії і виявляються у хворих з ураженням скелетних м'язів, кишківника і легеневою гіпертензією. У 95 - 100% хворих змішаним захворюванням сполучної тканини виявляють антитіла до U1-рибонуклеопротейдів у високому титрі. При системній склеродермії ці антитіла виявляються лише в 5 - 10% випадків. У сироватці хворих з перехресним синдромом, що поєднує ознаки системної склеродермії та синдрому Шегрена, можуть бути присутніми антитіла до антигенів Ro / SS-A і La / SS-B. Згідно з даними літератури, АЦА виявляються приблизно в 50% пацієнтів з лімітованим субтипом ССД [8], тобто вони є чутливим маркером для цього виду ССД і їх рідко знаходять при дифузній ССД [9]. V.D.Steen і співавт. [11] зазначають, що пацієнти з лімітованою ССД та наявністю АЦА мають легше ураження шкіри, ніж хворі з лімітованою ССД без наявності АЦА. Отже, залишаться не окресленими діагностичні критерії ряду АНА у хворих на ССД, їх залежність від характеру перебігу та особливостей клінічних проявів цього АСЗ.

Метою даної роботи було вивчення специфічності та чутливості антикулеарних антитіл

(АНА) у хворих на ССД та їх прогностичне значення у розвитку фібротичних ускладнень.

**МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ**

Нами було обстежено 104 хворих на ССД, хронічний перебіг мав місце у 72 хворих, підгострий – у 31, гострий – у одного; згідно з класифікацією E.C.LeRoy et al (1988) [10] лімітований субтип спостерігався у 88 хворих, дифузний субтип – у 11, перехресний синдром – у 5, а також 94 хворих на системний червоний вовчак (СЧВ) та 29 хворих на ревматоїдний артрит (РА) і 50 практично здорових осіб (контрольна група). Вік пацієнтів та осіб контрольної групи знаходився в межах 18-76 років. Діагноз встановлювався консиліумом з двох спеціалістів-ревматологів та лікаря клінічного імунолога на підставі адекватного клініко-лабораторно-інструментального об-

стеження з використанням критеріїв постановки діагнозу Американської асоціації ревматологів.

Для виявлення флуоресцентних АНА і АТ до центромер використовували метод непрямой імунофлуоресценції з застосуванням комерційної культури клітин Нер-2 (M.Fritzler, 1985), [7] а для виявлення АНА до екстрагованих нуклеарних антигенів СКЛ-70, : РНК-полімераза-I,-II,-III; Th-рибонуклеопроतेїду; РМ-1; U1, U3-рибонуклеопроतेїду (фібриларин); **Ro/SS-A; La/SS-B**. – метод подвійної імунодифузії з застосуванням екстракту з тимуса крілика, як джерела антигенів СКЛ-70, рибонуклеопротеїду, **La/SS-B**, РНК-полімерази та екстракту з волової селезінки, як джерела антигену **Ro/SS-A**. Чутливість та специфічність наборів діагностичних імунологічних критеріїв для ССД визначали за формулами:

$$\text{чутливість} = \frac{\text{кількість хворих на ССД, в яких діагноз відповідав діагностичним критеріям}}{\text{загальна кількість хворих на ССД}} \times 100\%$$

$$\text{специфічність} = \frac{\text{кількість хворих на інші РЗ, в яких діагноз не відповідав діагностичним критеріям}}{\text{загальна кількість хворих на інші РЗ}} \times 100\%$$

Апробовуючи набори діагностичних імунологічних критеріїв для інших АРЗ чутливість і специфічність вираховували за аналогічними формулами. При цьому було апробовано діагностичні критерії для СЧВ.

На основі отриманих клінічних результатів було створено цифрові бази даних, які опрацьовувались з використанням програм Microsoft Excel, що входить до пакету Microsoft Office та Statistica.

**ОТРИМАНІ РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ**

Після клінічного обстеження хворих на ССД, СЧВ, РА було проведено їх імунологічне обстеження.

У таблиці 1 вказані 4 типи ФАНА: гомогенний, периферичний, крапчастий і нуклеолярний у хворих з різними АРА. Як це видно з таблиці, ФАНА всіх чотирьох типів мали місце тільки у хворих на СЧВ і тільки при цій патології спостерігався периферичний тип свічення. Вважається [6,8], що периферична імунофлуоресценція пов'язана з циркуляцією антитіл до нативної ДНК. ФАНА з гомогенним, крапчастим і нуклеолярним типами свічення виявили при ССД, СЧВ і серед хворих саме на ці нозологічні одиниці відмічався найвищий відсоток пацієнтів з нуклеолярною імунофлуоресценцією. У здорових осіб виявлялися ФАНА лише з крапчастим типом свічення і у низькому відсотку випадків.

Таблиця 1

**Частота виявлення ФАНА при ССД та інших АРЗ**

АРЗ та Контрольна Група	ФАНА з різними типам свічення							
	Гомогенний тип		Периферичний тип		Крапчастий Тип		Нуклеолярний тип	
	К-ть хв	%	К-ть хв	%	К-ть хв	%	К-ть хв	%
ССД (n=104)	37	39	0	0	23	22	30	29
СЧВ (n=94)	27	29	23	24	25	27	6	6,4
РА (n=29)	10	34	0	0	11	38	2	6,9
Здорові особи (n=50)	0	0	0	0	3	6	0	0

До даних таблиці 1 необхідно додати, що в цілому відсоток ФАНА-позитивних пацієнтів серед хворих на ССД становив 87 %, серед хворих на СЧВ -86 %, серед хворих на РА – 83 % і серед осіб контрольної групи – 6 %. Різниця між відсотком ФАНА-позитивних пацієнтів серед хворих з аутоімунними хворобами (ССД, СЧВ, РА) з одного боку і серед здорових осіб - з другого боку була статистично вірогідною ( $p < 0,001$ ).

Враховуючи те, що ФАНА з гомогенною, крапчастою і нуклеолярною імунофлюоресценцією зустрічаються при всіх системних захворюваннях сполучної тканини, використовувати їх з метою проведення диференційної діагностики аутоімунних ревматичних процесів між собою не видається можливим. Вважається [3,6], що

тест визначення ФАНА повинен застосовуватися в ролі скринінгового перед пошуком антитіл до екстрагованих ядерних антигенів.

Нами був проведений аналіз найбільш специфічний АНА до певних ядерних структур у хворих на ССД. У таблиці 2 вказана чутливість специфічних антинуклеарних антитіл у хворих на ССД. Як це видно з таблиці 2, чутливість найбільш характерних для ССД АЦА і АСКЛ-70, за нашими даними, становила відповідно 29,8% та 17,3%. Чутливості U3-рибонуклеопротеїду (фібриларин); **Ro/SS-A**; **La/SS-B** були дуже низькими і не досягали статистично значимого рівня, а U1-рибонуклеопротеїду у когорті хворих на ССД, охоплених цим дослідженням, взагалі не виявлялися.

Таблиця 2

Чутливість АНА у хворих на ССД (n=104)

Показник	АНА						
	АЦА	АСКЛ-70А	Ro/SS-A	La/SS-B	U1-RNP	РНК-полімераза	Фібриларин
АНА-позитвні хворі, абсолютна кількість	3	18	6	1	0	9	4
Відсоток АНА-позитивних хворих, $P \pm mP$	29,8±4,5*	17,3±4,2*	5,8±4,1	0,96±0,8	0	8,7±5,3	3,8±2,1

Примітка. \* - показник статистично достовірний

Доцільно додати, що семеро з дев'яти РНК-полімераза позитивних хворих були одночасно СКЛ-70-позитивними, троє фібриларин хворих були одночасно **Ro/SS-A** -позитивними і у одного **La/SS-B** -позитивного хворого одночасно виявлялися **Ro/SS-A**.

Було вивчено АЦА і АСКЛ-70 у хворих на різні варіанти перебігу ССД за класифікацією [2] та на різні субтипи ССД за класифікацією [10]. Як це показано в таблиці 3, АЦА зустрічалися лише при хронічному перебігу (43%); АСКЛ-70 зустрічалися як при хронічному (8%), так і при підгострому перебігу (39%), але частіше при останньому.

Таблиця 3

АЦА і АСКЛ-70 у хворих на різні варіанти перебігу ССД (n=104)

Варіанти перебігу	АЦА		АСКЛ-70	
	абсолютна кількість хворих	відсоток хворих ( $P \pm mP$ )	абсолютна кількість хворих	відсоток хворих ( $P \pm mP$ )
Хронічний (n=72)	31	43,06±8,89	6	8,33±3,26
Підгострий(n=31)	0	0	12	38,71±8,75
Гострий (n=1)	0	0	0	0

Згідно з даними таблиці 4 АЦА спостерігались лише при лімітованому субтипі ССД (35%); СКЛ-70 зустрічалися як при лімітованому субти-

пі (14%), так і при дифузному субтипі (55%), але частіше при останньому.

Таблиця 4

АЦА і АСКЛ-70 у хворих на різні субтипи ССД (n=104)

Варіанти перебігу	АЦА		АСКЛ-70	
	абсолютна кількість хворих	відсоток хворих ( $P \pm mP$ )	абсолютна кількість хворих	відсоток хворих ( $P \pm mP$ )
лімітований (n=88)	31	35,23±5,09	12	13,64±3,66
дифузний (n=11)	0	0	6	54,55±15,01
перехресний синдром (n=5)	0	0	0	0

Підрахунок специфічностей АЦА для лімітованого субтипу і АСКЛ-70 для дифузного субтипу виявив: специфічність АЦА для лімітованого субтипу 100% і специфічність АСКЛ-70 для дифузного субтипу 87,1 ±3,48%. Як бачимо, перший показник перевищував, а другий показник не досягав 95-відсоткового рівня статистичної значимості.

Таким чином, якщо наявність АЦА є абсолютно специфічною для хронічного перебігу та лімітованого субтипу ССД, то присутність АСКЛ-70 хоча і характерна для підгострого перебігу та дифузного субтипу ССД, все ж не є для них специфічна. Сказане вище означає, що клінічну різницю між хронічним і підгострим перебігами в одному випадку та лімітованим і дифузним субтипами в другому, даними серологічного обстеження вдалося підтвердити лише частково. Наведені результати вказують на асоціацію АЦА з хронічним перебігом ССД за класифікацією Н.Г. Гусевої [2] і з лімітованим субтипом ССД за класифікацією Е.С. LeRoy et al. [10]; АСКЛ-70, в свою чергу, асоціюються відповідно з підго-

стрим перебігом і з дифузним субтипом за тими ж класифікаціями.

Відомо [2,6,8], що від розвитку бібазиллярного пневмофіброзу, кардіосклерозу, інтерстиціального фіброзу і ураження нирок у вигляді гломерулонефриту (клінічно найбільш важливі вісцерити) значною мірою залежать терміни виживання хворих на ССД. Оскільки, згідно з класифікаціями ССД Н.Г.Гусевої [2] та Е.С. LeRoy et al. [10] вісцерити є типовими для підгострого перебігу та дифузного субтипу і серед усіх 18-ти СКЛ-70-позитивних хворих вісцерити мали місце у 13-ти (у більшості з них спостерігалися полівісцерити), було вирішено провести порівняння частот клінічно найбільш важливих вісцеритів у АСКЛ-70-позитивних і АСКЛ-70-негативних хворих на ССД. Крім того, враховуючи те, що вісцерити є не характерними для хронічного перебігу та лімітованого субтипу, доцільним виглядало також проведення порівняння частот клінічно найбільш важливих вісцеритів у АЦА-позитивних та АЦА-негативних хворих на ССД (табл.5).

**Таблиця 5**

**Порівняння частот вісцеритів між АСКЛ-70-позитивними та АЦА-негативними та між АЦА-позитивними і АЦА-негативними хворими на ССД (хі-квадрат)**

Вісцерити	АСКЛ-70-позитивні хворі (1) n=18	АСКЛ-70-негативні хворі(2) n=86	P1-2	АЦА-позитивні хворі (1) n=18	АЦА-негативні хворі (2) n=86	P3-4
Бібазиллярний пневмофіброз, абс. Кільсть	11	28	>0,05	0	39	<0,001
Кардіосклероз, абс. Кількість	7	10	>0,05	0	17	<0,001
Фіброз кишківника абс. Кількість	7	11	>0,05	0	18	<0,001
Гломерулонефрит, абс. кількість	5	2	>0,05	0	7	<0,001

Як це видно з таблиці 5, частота виникнення бібазиллярного пневмофіброзу, кардіосклерозу, інтерстиціального фіброзу та гломерулонефриту у АСКЛ-70-позитивних хворих достовірно переважала, цей показник у АСКЛ-70-негативних хворих; перераховані вище вісцерити не зустрічались в жодного АЦА-позитивного хворого і різниця за цими показниками з АЦА-негативними хворими була статистично значимою. Вказані дані свідчать про те, що наявність АСКЛ-70 у хворих на ССД слід вважати фактором ризику розвитку бібазиллярного пневмофіброзу, кардіосклерозу, інтерстиціального фіброзу та ураження нирок у вигляді гломерулонефриту, а наявність АЦА слід вважати прогностичним фактором відсутності розвитку названих вище вісцеритів.

Таким чином, результати вивчення АНА при ССД дають змогу зробити наступні висновки:

1. Тести визначення АЦА і АСКЛ-70 є цінними для діагностики ССД, оскільки при чутливості відповідно 30% та 17% вони володіють специфічністю 99% та 100%.
2. АЦА є маркером хронічного перебігу і лімітованого субтипу ССД, так як у них встановлена чутливість 43% та 35% відповідно, специфічність - 100% та 100%.
3. Наявність у хворих на ССД АЦА слід вважати прогностичним фактором відсутності розвитку ускладнень: пневмофіброз, кардіосклероз та ураження нирок у вигляді гломерулонефриту.

4. АСКЛ-70 є характерними, але не специфічними для підгострого перебігу і дифузного субтипу ССД, оскільки володіють при них відповідно чутливістю 41 % та 55% і специфічністю 92% та 87%.
5. Наявність у хворих на ССД АСКЛ-70 слід вважати фактором ризику розвитку таких вісцеритів, як пневмофіброз, кардіосклероз, інтерстиціального фіброзу та ураження нирок у вигляді гломерулонефриту.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Баткаев Э.А. Склеродермия. Учебное пособие. Российская медицинская академия последипломного образования/ Э.А.Баткаев, Ю.А. Галямова– М.: Медицина. – 2007. – 321 с.
2. Гусева Н.Г. Современная стратегия патогенетической терапии системной склеродермии /М.:Терапевт.архив. – 1997. – №5. – С. 79-81.
3. Караулов А.В. Клиническая иммунология и аллергология. Учебное пособие./ А.В. Караулов. – М.: Медицина. – 2002. – 651 с.
4. Надашкевич О.Н. До питання імунологічного статусу при системній склеродермії/ О.Н.Надашкевич // Львівський медичний часопис. – 2009. – №1. – С.17-18.
5. Яцишин Р.І. Системна склеродермія. Особливості патогенезу та імунної регуляції захворювання/ Р.І.Яцишин// Укр. ревмат. журнал. – №8. – 2009. – С. 17-20.
6. Arad U. Anti-Neutrophil Antibody Associated Vasculitis in Systemic Sclerosis. Semin Arthritis/ U. Arad, A. Balbir-Gurman, K. Doenya-Barak, M. Amit-Vazina, // Rheum. – 2011. – №15. – P. 66-69.
7. Fritzler M., Tan E. Antinuclear antibodies and connective tissue diseases // Lab. Diagnost. Proceed. Rheum. Dis. – 1985. – Vol. 8. – P. 207-247.
8. Frech T. Prevalence and correlates of sleep disturbance in systemic sclerosis-results from the UCLA scleroderma quality of life study/ T.Frech, R.D. Hays, P.Maranian//Rheumatology (Oxford). – 2011. – №1. – P.12-16.
9. Leask A. The role of endothelin-1 signaling in the fibrosis observed in systemic sclerosis./ A. Leask // Pharmacol Res.- 2011.-№14.-P.69-72.
10. LeRoy E.G. A brief overview of the pathogenesis of scleroderma (systemic sclerosis) // Ann. Rheum. Dis. – 1992. – Vol. 51. – P. 286-288.
11. Sattar M.A. Penicillamine in systemic sclerosis: a reappraisal / M.A.Sattar, R.T.Guindi, T.N. Sugathan // Clin. Rheumatol. – 2008. – Vol.9. – P. 517-522.
12. Steen V.D., Medsger T.A. Severe organ involvement in systemic sclerosis with diffuse scleroderma // Arthritis Rheum. – 2000. – Vol. 43. – P.2437-2444.

### РЕЗЮМЕ

#### СПЕЦИФІЧНІСТЬ ТА ЧУТЛИВІСТЬ АУТОАНТИТІЛ У ХВОРИХ З РІЗНИМИ СУБТИПАМИ СКЛЕРОДЕРМІЇ

ГАЄВСЬКА В.Ю., НАДАШКЕВИЧ О.Н., ГУТОР Т.Г.

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

Нами було обстежено 104 хворих на ССД, хронічний перебіг мав місце у 72 хворих, підгострий – у 31, гострий – у одного. Для виявлення флуоресцентних АНА і АТ до центромер використовували метод непрямой імунофлуоресценції з застосуванням комерційної культури клітин HEP-2 (M.Fritzler, 1985), а для виявлення АНА до екстрагованих нуклеарних антигенів СКЛ-70, : РНК-полімераза-I, -II, -III; Th-рибонуклеопротейду; РМ-1; U1, U3-рибонуклеопротейду (фібриларин); **Ro/SS-A; La/SS-B**. – метод подвійної імунодифузії з застосуванням екстракту з тимуса крілика, як джерела антигенів СКЛ-70, рибонуклеопротейду, **La/SS-B**, РНК-полімерази та екстракту з волової селезінки, як джерела антигену **Ro/SS-A**. АСКЛ-70 є характерними, але не специфічними для підгострого перебігу і дифузного субтипу ССД, оскільки володіють при них відповідно чутливістю 41 % та 55% і специфічністю 92% та 87%. Наявність у хворих на ССД АСКЛ-70 слід вважати фактором ризику розвитку таких вісцеритів, як пневмофіброз, кардіосклероз, інтестинальний фіброз та ураження нирок у вигляді гломерулонефриту.

### SUMMARY

#### SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF AUTOANTIBODIES IN PATIENTS WITH DIFFERENT SUBTYPES OF SYSTEMIC SCLEROSIS

HAYEVSKA V. Yu., NADASHKEVYCH O. N., GUTOR T. G.

Lviv National Medical University named by Danylo Halyskyj

We have examined 104 patients with SSc, chronic occurred in 72 patients, subacute - in 31, acute - in the other. For fluorescent detection of ANA and antibodies to centromere, the method of indirect immunofluorescence using commercial cell culture HEP-2 (M.Fritzler, 1985), and for detection of ANA to the nuclear antigens extracted Scl-70: RNA-polymerase-I, II, III; Th-RNP, RM-1; U1, U3-RNP (fibrylaryn); Ro/SS-A; La/SS-B by method of double immunodiffusion using rabbit thymus extract as antigen source Scl-70, RNP, La/SS-B, RNA polymerase and extract with cowhide spleen as a source of antigen Ro/SS-A. AScl-70 are characteristic but not specific to a subacute course and diffuse SSc subtypes, as they have in them under 41% sensitivity and 55% and specificity 92% and 87%. The presence of patients with SSc AScl-70 should be considered a risk factor for development of such visceritis as pneumofibrosis, cardiosclerosis, intestinal fibrosis and kidney damage in the form of glomerulonephritis.