

Wstępne badania nad metodyką oznaczania surowiczych autoprzeciwciał niezaliczanych do kryteriów diagnostycznych układowych chorób tkanki łącznej

Preliminary data concerning methodology of assessment of serum autoantibodies not included into CTS-s diagnostic criteria

Jakub Ząbek, Agnieszka Palacz, Iwona Krzewska, Joanna Pyka

Zakład Mikrobiologii i Serologii Instytutu Reumatologii im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher w Warszawie,
kierownik Zakładu dr hab. biol. Jakub Ząbek, dyrektor Instytutu prof. dr hab. med. Sławomir Maśliński

Słowa kluczowe: układowe choroby tkanki łącznej, autoprzeciwciała markerowe, autoprzeciwciała pomocnicze, diagnostyka serologiczna.

Key words: connective tissue diseases, “marker” autoantibody, so called “auxiliary” autoantibodies, “serological diagnostic methods”.

Streszczenie

Autrzy przedstawili wstępne dane dotyczące nowego sposobu kompleksowego podejścia do analizy surowic ANA-dodatnich, w których nie udało się ustalić konkretnej swoistości, polegającej na neutralizacji i usunięciu z ww. surowic preparatem ENA (pochodzenia grasiczego lub śledzionowego) przeciwciał *maskujących* (współzawodniczących) w teście ANA-Hep-2. Przeprowadzono następnie analizę zneutralizowanych surowic testami ELISA i Western-blott (bazujących na pełnym ekstrakcie komórek Hep-2) w celu ustalenia swoistości autoprzeciwciał *pomocniczych* dyktowanych przez podstawowy typ ANA.

Summary

Authors are presenting preliminary data introducing a new way of complex analysis of the sera (ANA-positive but without estimated certain specificity), using for the neutralization and removing of “masking” (competing) antibodies (in the test ANA-Hep-2) a full bovine and spleen soluble protein extracts/called ENA, followed by further analysis of the antibody specificities present in neutralized sera by specific ELISA or Western-blott tests dependently on the basic pattern of ANA in the serum.

Wprowadzenie

Autoimmunizacja, a więc występowanie autoprzeciwciał i limfocytów autoreaktywnych w surowicach pacjentów z układowymi chorobami tkanki łącznej, jest fenomenem występującym ze szczególnie dużym natężeniem w tzw. układowych chorobach tkanki łącznej, np. w toczeniu trzewnym układowym (*systemic lupus erythematosus* – SLE), reumatoidalnym zapaleniu stawów (RZS), zespole Sjögrena [1, 2].

Autoprzeciwciała, szczególnie te z grupy tzw. przeciwciał przeciwjądrowych (ang. ANA), ze względu na wysoką swoistość w stosunku do określonych jednostek chorobowych, wartość prognostyczną oraz związek z chorobami układowymi zostały zaliczone do kryteriów diagnostycznych poszczególnych jednostek. Jednakże ze względu na *mozaikowy* typ odpowiedzi autoprzeciwciałowej w znacznej części surowic nie stwierdza się autoprzeciwciał *markerowych* – koniecznych czasem do postawienia diagnozy wg kryteriów ARA [3].

Adres do korespondencji:

dr hab. biol. Jakub Ząbek, Zakład Mikrobiologii i Serologii, Instytut Reumatologii im. prof. dr hab. med. E. Reicher, ul. Spartańska 1, 02-637 Warszawa

Niepowodzenia w diagnostyce przeciwciał markerowych są spowodowane przez wiele czynników.

W pracy pt. *Podstawowe zasady racjonalnej serodiagnostyki autoprzeciwciał markerowych w układowych chorobach tkanki łącznej* [4] zaproponowano pewien typ kompleksowego podejścia, nazwany metodą kaskadową oznaczania swoistości przeciwciał ANA, który eliminuje wiele przyczyn niepowodzeń w ustalaniu swoistości autoprzeciwciał markerowych, wynikających głównie ze składu antygenów testów.

Jednakże w ok. 20–25% przypadków w ogóle nie udaje się ustalić swoistości, pomimo nieraz wysoko pozytywnego wyniku testu ANA [5, 6]. W takich sytuacjach należy sięgnąć po identyfikację przeciwciał niewłączonych do kryteriów diagnostycznych, traktując je jako oznaczenie uzupełniające.

Przystępując do tego typu specjalnej procedury identyfikacyjnej, trzeba kierować się przede wszystkim typem świecenia (bądź wybarwienia w metodzie immunoperoksydazowej) ANA, ponieważ zawęży on zakres poszukiwanych autoprzeciwciał, a wiadomo, że określonemu typowi (ang. *patterns*) ANA odpowiada określona grupa autoprzeciwciał [1, 2].

Dodatkową istotną informacją byłyby dane kliniczne, które mogą wskazywać na określony typ schorzenia, ale nie spełniają kryteriów diagnostycznych. Jeśli zatem mamy do czynienia ze sprzecznością obrazu klinicznego i typu ANA, to należy wziąć pod uwagę możliwość przystaniania miejsc wiązania przeciwciała swoistego i zmiany obrazu końcowego typu ANA. Istnieje zatem konieczność zastosowania sorbentu (lub sorbentów), np. ekstraktów grasiczych (RTE – ang. *rabbit thymus extract*) czy śledzionowych (BSE – ang. *bovine spleen extract*), które są bogate w określone typowe autoantygenu. RTE zawiera np. kilka podstawowych antygenów, określanych jako antygenu ENA (ang. *extractible nuclear antigen*), takich jak Sm, RNP, SSA i B, Scl-70, i ślady wielu innych, np. Jo-1 [7, 8].

Celem pracy było sprawdzenie, czy zastosowanie do surowic (ANA-dodatnich – o nieustalonej swoistości) techniki neutralizacji ekstraktami antygenu ENA (grasiczymi lub śledzionowymi) pozwoli na ustalenie swoistości występujących autoprzeciwciał z grupy autoprzeciwciał tzw. pomocniczych, co mogłoby być użyteczne w diagnostyce różnicowej układowych chorób tkanki łącznej.

Materiał i metody

Do badań użyto surowice pobrane od 8 pacjentów kliniki IR, przesłane do Zakładu Mikrobiologii i Serologii w celu oznaczenia przeciwciał ANA oraz wytypowania swoistości. W tych surowicach, pomimo dodatniego wyniku testu ANA, nie udało się ustalić swoistości przeciwciał.

W surowicach wykonano oznaczenie przeciwciał ANA metodą *Colorzyme* z zastosowaniem komórek Hep-2 na zestawach firmy Immuno Concepts (USA). Typowanie swoistości wykonywano testami paskowymi DOT-blot firmy Biomedica oraz w miarę potrzeb testem Western-blotting Euroline W.B. firmy Euroimmun. Oznaczenie przeciwciał dla natywnego DNA wykonywano testem ELISA (Varelisa firmy HVD Holding) oraz na szkiełkach z utrwalonymi pierwotnikami *Critidia luciliae* firmy Immuno Concepts (USA). Oznaczenie przeciwciał dla NuHi wykonywano testem ELISA Aeskulisa firmy Pointe Scientific Polska. Oznaczenia pozostałych przeciwciał, tj. przeciwciał dla ssDNA, RNA, histonów, ubikwityny, HMG oraz Ku, wykonywano wg procedur ELISA dopracowanych w Zakładzie Mikrobiologii i Serologii IR z zastosowaniem wysoko oczyszczonych antygenów: histonu pełnego i frakcji, ssDNA, RNA i ubikwityny (wszystkie firmy Fluka).

Preparat pełnego (częściowo oczyszczonego) HMG, użytego w teście ELISA, uzyskano z grasicy cielęcej wg metody Goodwina i wsp. [9], w której wykorzystano jako czynnik strącający białka 2% kwas trójchlorooctowy (TCA), w którym białka HMG są rozpuszczalne.

Neutralizację surowic ekstraktami RTE oraz BSE wykonano wg własnej procedury.

Surowicę rozcieńczoną, tak by dawała wyraźny i czytelny typ ANA (zwykle 1–2 rozcieńczenia poniżej miana końcowego), mieszano ze standaryzowanymi ekstraktami grasiczymi i śledzionowymi (RTE i BSE) w stosunku 1:1 i inkubowano 3 godz. w temperaturze 37°C, a następnie przez noc w temperaturze 4°C. Po inkubacji surowice wirowano przy 10 000 obrotów/min przez 20 min i używano do oznaczania miana i typu ANA.

Standaryzacja preparatów BSE i RTE polegała na dodawaniu zawsze tych samych ilości białka w ekstraktach, a ponadto drogą neutralizacji testów Western-blotting ustalano, czy zawierają one podstawowe typowe antygenu ENA, czyli Sm, RNP, Ro, La, Scl-70 i Jo-1.

Wyniki

We wszystkich 8 surowicach ANA-dodatnich, tam gdzie nie udało się ustalić swoistości autoprzeciwciał klasycznymi metodami (po ustaleniu końcowego miana przeciwciał przeciwjądrowych) przystąpiono do typowania swoistości wg klasycznego schematu, zakładając, że określonemu typowi *wybarwienia* w technice immunoperoksydazowej odpowiada określony zestaw autoprzeciwciał [1, 2, 4], z uwzględnieniem dodatkowych procedur opublikowanych uprzednio, a służących do określania swoistości autoprzeciwciał dla podtypów (ang. *fine specificities*) autoantygenu, a następnie do oznaczania autoprzeciwciał niezaliczanych do kryteriów diagnostycznych układowych chorób tkanki łącznej.

Tabela I. Sumaryczne zestawienie danych uzyskanych w wyniku zastosowania procedur wszystkich stopni obecności autooprzeciwciał oraz ich podtypów zaliczonych do kryteriów i autooprzeciwciał niezakwalifikowanych
Table I. Summary of indexed data obtained as a result of applying of the all steps procedures used for autoantibodies and their fine specificities assessment which are included into the diagnostic criteria

Nr surowicy	Pacjent	ANA	DOT-blot	dsDNA	Autooprzeciwciała pomocnicze dla*	Neutralizacja		Western-blott Hep-2
						zmniejszenie miana ANA**	zmiana typu ANA	
15811	nr 1	1280 hp	(-)	(-)	ubikwityny	2/3↓	b.z.	a-UQ ±
16404	nr 2	1280 hp	(-)	(-)	(-)	2↓	b.z.	surowica wieloswoista
16301	nr 3	1280 hp	(-)	(-)	± ubikwityny	2↓	b.z.	aKu 86 kD
16310	nr 4	1280 hp	(-)	(-)	nukleohistonu	1↓	na jąderkowy	st. (+) aNuHi
16136	nr 5	1280 hp	(-)	(-)	± NuHi	1↓	b.z.	aKu (86 kD) aKu (72 kD)
16201	nr 6	1280 pl	histon – ślad	(-)	(-)	1↓	b.z.	aKu (86 i 72 kD) aRNP (70 kD) ±
16190	nr 7	640 pl	(-)	(-)	(-)	b.z.	b.z.	aKu (72 kD) aRo (60 kD)
15781	nr 8	10240 pl	(-)	(-)	(-)	2↓	na jąderkowy	aKu (86 kD) aKu (72 kD)

* przeciwciała dla NuHi, ubikwityny, HMG i Ku

** 1↓ – nieznaczne zmniejszenie miana ANA

2↓ – umiarkowane zmniejszenie miana ANA

3↓ – duży spadek miana ANA

b.z. – bez zmian

Sumaryczne zestawienie danych uzyskanych w wyniku zastosowania procedur wszystkich trzech stopni, tj. ustalenia obecności autooprzeciwciał zakwalifikowanych do kryteriów oraz ich podtypów i autooprzeciwciał niezaliczanych, przedstawiono w tab. I.

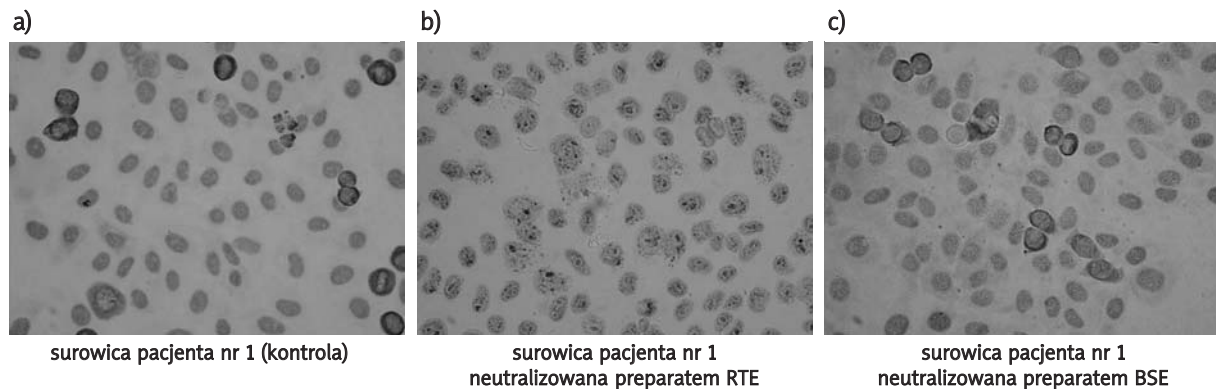
Surowica nr 1 miano ANA 1/1280 typ homogenno-plamisty. Wynik testu na obecność dsDNA oraz testu DOT-blot negatywny, także wynik testu Western-blot bazującego na pełnym ekstrakcie komórki Hep-2 również ujemny. Ponieważ identyfikacja swoistości została wykonana na testach zawierających wszystkie główne podtypy autoantygenów dających plamisty typ ANA, pozostała zatem identyfikacja antygenów dających homogeny typ ANA (z wyjątkiem anty-dsDNA już wykonanego) oraz sprawdzenie, czy w pełnych ekstraktach z grasicy króliczej i śledziony bydłowej nie występują rzadsze autoantygeny białkowe, które mogą w teście neutralizacji spowodować zanik lub osłabienie miana testu ANA. I rzeczywiście, w przypadku obu ekstraktów (RTE i BSE) uzyskano neutralizację odczynu ANA, co oznacza, że są w nich autoantygeny neutralizujące przeciwciała odpowiedzialne za homogenno-plamisty

typ ANA. Przykładowe efekty neutralizacji surowicy pacjenta nr 1 przedstawiono na ryc. 1.

Wykonano zatem oznaczenie metodą ELISA następujących autooprzeciwciał (dających homogeny typ ANA): anty-NuHi, anty-histon – pełny, anty-HMG – pełne, przeciw ubikwitynie oraz anty-ssDNA i anty-RNA. Testem ELISA wykazano obecność słabo dodatnich poziomów przeciwciał dla ubikwityny.

W przypadku surowicy pacjenta nr 2 przy zastosowaniu analogicznej procedury, jak w przypadku pacjenta nr 1 nie udało się zidentyfikować swoistości ANA, ponieważ surowica ta wykazuje typową dla wielu surowic w przypadku układowych chorób tkanki łącznej wieloswoistość, polegającą na występowaniu (np. w teście Western-blot) podprogowych poziomów autooprzeciwciał dla wielu autoantygenów. Jest to prawdopodobnie wynik poliklonalnej stymulacji układu immunologicznego, np. przez superantygeny bakteryjne czy wirusowe.

W surowicach trzech dalszych pacjentów (nr 3–5) – wszystkie testy ANA wysoko dodatnie (miano 1/1280 o typie homogenno-plamistym), również nie ustalono swoistości ANA, a po wykonaniu dodatkowych testów



Ryc. 1. Wybrany przykład zmiany typu świecenia ANA w surowicy pacjenta nr 1 (a), po neutralizacji preparatami, tj. ekstraktami pełnymi grasicy króliczej (RTE) (b), śledziony wołu (BSE) (c).

Fig. 1. Selected examples showing of ANA "patterns" switch after neutralisation serum of no 1 patient with using of full rabbit thymus (RTE) and bovine spleen (BSE).

w kierunku przeciwciał dających homogenno-plamisty typ ANA stwierdzono:

- w surowicy pacjenta nr 3 podprogowe poziomy przeciwciał dla NuHi i ubikwityny, wykonany zaś test Western-blokt na pełnym ekstrakcie komórek Hep-2 wykazał obecność jednego prążka o ciężarze cząsteczkowym 86 kD (charakterystycznego dla przeciwciał anty-Ku),
- w surowicy pacjenta nr 4 wykazano tylko obecność przeciwciał dla nukleohistonu (NuHi),
- w surowicy pacjenta nr 5 obok podprogowych poziomów przeciwciał dla NuHi wykazano obecność przeciwciał dla obu izotopów antygeny Ku (o ciężarze cząsteczkowym 86 i 72 kD).

Wymienione wyżej 3 surowice o typie ANA homogenno-plamistym wykazywały osłabienie natężenia odczynu ANA (w teście *Colorzyme*) po neutralizacji pełnymi ekstraktami RTE i BSE – w przypadku surowic pacjentów nr 3 i 5 tylko osłabienie, a w przypadku surowicy pacjenta nr 4 także zmianę typu ANA z homogenno-plamistego na jąderkowy (co może być cenną wskazówką kliniczną).

Pozostałe 3 surowice pacjentów (nr 6–8) (ANA-dodatnie), także po neutralizacji RTE i BSE wykazały osłabienie intensywności odczynu ANA-Hep-2 (w technice *Colorzyme*), a surowica pacjenta nr 8 także wyraźną zmianę typu ANA (z homogenno-plamistych na jąderkowe). Nie wykazano w żadnej z nich obecności przeciwciał charakterystycznych dla antygenów chromatynowych, z wyjątkiem przeciwciał dla antygeny Ku (we wszystkich trzech surowicach), a w surowicy pacjenta nr 6 po neutralizacji wykazano obecność podprogowych poziomów przeciwciał dla izotypu antygeny U_{15n} RNP o ciężarze cząsteczkowym 70 kD.

Dyskusja

We wszystkich 8 surowicach, w których klasyczną metodą ustalania swoistości, tj. najpierw wykonanie testu ANA (na komórkach Hep-2 metodą *Colorzyme*), a następnie wykonanie testu DOT-blokt, umożliwiającego oznaczenie podstawowych autoprzeciwciał markerowych, nie udało się ustalić swoistości, wykonano zatem neutralizację surowic preparatami ekstraktów z grasicy króliczej oraz śledziony bydlęcej. W 7 na 8 (87%) surowic uzyskano wyraźne osłabienie natężenia (intensywności odczynu ANA w metodzie *Colorzyme*), a w 4 na 8 *wyminuszowanie* odczynu ANA. Wstępne wyniki zastosowanej procedury (adsorpcja przeciwciał z grupy ENA) wskazują zatem, że może być ona użyteczna w przybliżonym ustalaniu przypuszczalnej swoistości autoprzeciwciał spoza głównego panelu autoprzeciwciał *markerowych*, a w każdym razie w istotny sposób zawęża zakres poszukiwań, co daje oszczędność w liczbie zużytych testów.

W 5 surowicach (o mianie średnim ANA 1/1280 i typie homogenno-plamistym) nie udało się ustalić swoistości przeciwciała *pomocniczego* tylko w przypadku surowicy wieloswoistej, tj. takiej, w której na DOT-bloktach obserwuje się podprogowe poziomy autoprzeciwciał (z grupy przeciwciał markerowych), co może być wynikiem poliklonalnej stymulacji układu odpornościowego, np. przez superantygeny [10].

Stosunek (logiczny) okazało się także podążanie za dominującym typem świecenia, w przypadku ww. 5 surowic był to typ homogenny z nieznaczną domieszką plamistego, i poszukiwanie autoprzeciwciał dających homogenny typ wybarwienia ANA, a mianowicie przeciwciała przeciwko ssDNA i dsDNA, RNA, NuHi, nQ, białek HMG oraz antygeny Ku. Co istotne, w 3 przypadkach uzyskano identyfikację swoistości

(patrz tab. I). Co prawda poziomy tych przeciwciał nie w pełni tłumaczy wysokie miano całkowite ANA (średnio 1/1280), ale prawdopodobnie w surowicach pacjentów oprócz przeciwciał o określonej swoistości oraz znacznej awidności, ewentualnie powinowactwie, występuje pula przeciwciał o małej awidności i/lub powinowactwie, które mogą maskować typ świecenia poprzez wiązanie się z substratem (antygenem) na komórkach Hep-2, jednocześnie zwiększając miano całkowite ANA.

Będzie to przedmiotem dalszych badań, czy pule wyżej opisanych autoprzeciwciał występują w tych surowicach i czy zmiana warunków odczynu na dyskryminujące przeciwciała o małym powinowactwie/awidności będzie miała istotny wpływ na częstość (%) wykrywania autoprzeciwciał, a zmiana warunków (zwłaszcza siły jonowej) spowoduje dodatkowo eliminację autoprzeciwciał *maskujących*, co jest istotne w diagnostyce różnicowej swoistości autoprzeciwciał. Jest to prawdopodobne, ponieważ – wg wiedzy autorów – tylko w opisach niektórych testów służących do oznaczania przeciwciał dla dsDNA są notki, że test służy do oznaczania przeciwciał o znacznym powinowactwie/awidności – charakterystycznym dla fazy zaostżenia tocznia [8]. Pojawienie się po adsorpcji (neutralizacji) preparatów RTE i BSE ANA typu jąderkowego wskazywało na obecność przeciwciał o swoistości dla antygenów jąderkowych (np. Pm-Scl, Ku oraz atypowych RNA jąderkowych) [1, 2].

Zastosowanie testu typu Western-blott, opartego na pełnym ekstrakcie komórek Hep-2, pozwoliło w 5 surowicach ustalić obecność przeciwciał dla antygeny Ku [11]. Jest to antygen chromatynowy, dla którego przeciwciała występują w ok. 19% aktywnego tocznia rumieniowatego układowego [1], choć występują także w zespole nakładania PM/DM i PM/twardzina [12].

Ograniczona liczebność badanej grupy surowic nie pozwala na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków, ale prace są kontynuowane i autorzy sądzą, że zastosowanie specjalnej procedury pozwoli na rozstrzygnięcie przyczyn seronegatywności (co do swoistości autoprzeciwciał) przy wysokich mianach całkowitych ANA.

Podsumowując wyniki, należy stwierdzić, iż zastosowana procedura neutralizacji surowic ANA-wysoko dodatnich, w których ekstraktami płynów grasicy króliczej lub śledziony bydłowej nie udaje się potwierdzić obecności autoprzeciwciał *markerowych*, pozwala na usunięcie przeciwciał przeciwko antygenom ENA, blokujących odczyn i odśrojenie epitopów przeciwciał spoza panelu przeciwciał dla antygeny ENA, a to może mieć znaczenie przy diagnostyce różnicowej układowych chorób tkanki łącznej – w przypadku nieobecności markerów serologicznych.

Piśmiennictwo

1. von Muhlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum* 1995; 24: 323-58.
2. Manual of Biological Markers of Disease. van Venrooij WJ, Maini RN (eds). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston, London 1994.
3. Dugawson CE, Nelson JL, Koepsell TD. Evaluation of the 1987 revised criteria for rheumatoid arthritis in a cohort a newly diagnostic female patients. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 1042-6.
4. Ząbek J. Podstawowe zasady racjonalnej serodiagnostyki autoprzeciwciał markerowych w układowych chorobach tkanki łącznej. *Reumatologia* 2005; 43: 335-40.
5. Ząbek J. Przyczyny niepowodzeń w identyfikacji swoistości autoprzeciwciał ANA w surowicach pobranych od pacjentów z układowymi chorobami tkanki łącznej. *Reumatologia* 2004; 42: 416-26.
6. Ząbek J, Palacz A, Musiej-Nowakowska E i wsp. Porównanie wartości diagnostycznej przeciwciał dla nukleosomów z innymi markerami serologicznymi występującymi w toczniu rumieniowatym układowym. *Reumatologia* 2004; 42: 507-14.
7. Luft S. Wstęp. Podstawy i perspektywy diagnostyki serologicznej w reumatologii. W: *Metody diagnostyki serologicznej w reumatologii*. Luft S (red.). Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa 1996: 9-32.
8. Puszczewicz M. Badania serologiczne w diagnostyce chorób reumatycznych. *Nowa Klinika* 2004; 9: 1193-8.
9. Goodwin GH i wsp. (cyt. za Gröbner S). Właściwości i funkcja białek niehistonowych o wysokiej ruchliwości elektroforetycznej. *Postepy Biochem* 1982; 28: 487-501.
10. Ząbek J. Metody wykrywania autoprzeciwciał „markerowych” w chorobach z autoimmunizacją. W: *Immunologia kliniczna*. Kowalski ML (red.). Mediton Oficyna Wydawnicza, Łódź 2000: 787.
11. Fritzler MJ. Autoantibodies in scleroderma. *J Dermatol* 1993; 20: 257-68.
12. Mimori T, Akizuki M, Yamagata H, et al. Characterization of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis-scleroderma overlap. *J Clin Invest* 1981; 68: 611-20.