

## Przeciwciała przeciw cytoplazmie granulocytów obojętnochłonnych w płynie stawowym chorych na reumatoidalne zapalenie stawów

*Antineutrophil cytoplasmic antibodies in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis*

**Mariusz Puszczewicz**

Pracownia Diagnostyki Reumatologicznej przy Katedrze i Klinice Reumatologiczno-Rehabilitacyjnej i Chorób Wewnętrznych Akademii Medycznej w Poznaniu, kierownik Katedry i Kliniki: dr hab. med. Mariusz Puszczewicz

**Słowa kluczowe:** ANCA, płyn stawowy, reumatoidalne zapalenie stawów.

**Key words:** antineutrophil cytoplasmic antibodies, synovial fluid, rheumatoid arthritis.

### Streszczenie

Przeciwciała przeciw cytoplazmie granulocytów obojętnochłonnych (ANCA) są uważane za szczególnie istotny wykładnik serologiczny zapaleń naczyń, głównie ziarniniaka Wegenera, *microscopic polyangiitis* oraz zespołu Churga i Strauss. Stwierdzano je także w innych chorobach reumatycznych, m.in. u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów (RZS). Do chwili obecnej nie określono ostatecznie częstości występowania oraz roli ANCA w RZS.

Celem pracy była ocena częstości występowania i charakterystyka ANCA w płynie stawowym chorych na reumatoidalne zapalenie stawów. Materiał do badań stanowiły płyny stawowe uzyskiwane od 377 chorych na RZS. Grupę kontrolną stanowiło 183 chorych ze zmianami zwyrodnieniowymi. Uzyskane do badań surowice poddano ocenie typu i miana ANCA metodą immunofluorescencji pośredniej, natomiast swoistość ANCA oceniano metodą ELISA. Występowanie ANCA w płynie stawowym wykazano u 28,6% chorych na RZS. Okołojądrowy typ ANCA stwierdzono u 80,5% chorych, a atypowy u 19,4% osób. W 19,6% przypadków ANCA obecne w płynie stawowym reagowały z mieloperoxydazą, u 44,1% reagowały one swoiście z laktoferyną, natomiast w 9,8% przypadków ANCA wykazywały swoistość w stosunku do lizozymu. U 18,6% badanych przeciwciała te reagowały swoiście z katępsyną G, a u 7,8% ANCA wykazywały swoistość w stosunku do elastazy. W żadnym przypadku ANCA nie stwierdzono swoistości dla proteiny 3. Przeciwciała przeciw cytoplazmie granulocytów obojętnochłonnych w klasie IgM obserwowano w 24,5% przypadków, w 75% ANCA występowały w klasie IgG. Stwierdzono je głównie w podklasie IgG1 u 45% i podklasie IgG3 u 35% chorych.

### Summary

ANCA presence in rheumatic diseases has been well documented. The frequency and clinical significance of ANCA in patients with rheumatoid arthritis are not well established.

The aim of the study was to evaluate the prevalence and specificity of antineutrophil cytoplasmic antibodies in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis.

Synovial fluid samples were obtained from 377 patients with rheumatoid arthritis without symptoms of vasculitis. The control group was taken from 183 patients with osteoarthritis. ANCA titers and type were determined by indirect immunofluorescence method (IIF). Antigenic specificity was detected by ELISA method. ANCA were found by IIF in 28.6% of patients with rheumatoid arthritis. Perinuclear pattern of ANCA was observed in 80.5% and atypical ANCA in 19.4% of cases. We did not observe C-ANCA or reactivity against proteinase 3. In 19.6% of synovial fluid samples, ANCA yielded reactivity against myeloperoxidase, in 44.1% against lactoferrin and in 9.8% against lysozyme. 18.6% of cases indicated reactivity against cathepsin G and elastase. IgM-ANCA were detected in 24.5% and IgG ANCA in 75% of cases. In 45% it was IgG1 class and in 35% IgG3.

### Adres do korespondencji:

dr hab. med. Mariusz Puszczewicz, Katedra i Klinika Reumatologiczno-Rehabilitacyjna i Chorób Wewnętrznych, Akademia Medyczna, ul. 28 Czerwca 1956 r. 135/147, 61-545 Poznań, tel. +48 61 831 02 71, faks +48 61 831 02 71, e-mail: puszczewicz@hotmail.com

Praca wpłynęła: 6.09.2006 r.

## Wstęp

Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) należy do grupy układowych chorób tkanki łącznej, która charakteryzuje się przewlekłym procesem zapalnym o podłożu autoimmunologicznym. Zapalenie zostaje zapoczątkowane przez nieznaną przyczynę lub czynniki i ma charakter przewlekłe postępujący. W jego trakcie dochodzi do zajęcia wielu narządów i układów. Proces zapalny w przebiegu RZS obejmuje głównie błonę maziową stawów, tkanki okołostawowe oraz narządy mięśniowe, prowadząc do ich uszkodzenia. W przebiegu układowych chorób tkanki łącznej stwierdza się różnego rodzaju zaburzenia odpowiedzi immunologicznej zarówno typu komórkowego, jak i humoralnego. Ich przejawem jest m.in. obecność w surowicy krwi i płynach ustrojowych autoprzeciwciał reagujących z różnymi antygenami. Autoantygenami mogą być składowe komórki znajdujące się na błonie komórkowej, w cytoplazmie, czy choćby antygeny jądra komórkowego. Mogą nimi być także cząsteczki białka – fragment Fc immunoglobulin. Przeciwciała te, poza rolą, którą odgrywają w patogenezie niektórych jednostek chorobowych, mogą mieć znaczenie diagnostyczne. Czynniki reumatoidalne i przeciwciała przeciwjądrowe to najczęściej wykrywane autoprzeciwciała u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów. W jego przebiegu wykazano także m.in. przeciwciała przeciw cyklicznie cytrulinowanemu peptydowi (aCCP), przeciw keratynie i przeciw cytoplazmie granulocytów obojętnochłonnych (ANCA). A-CCP swoiście reagują z determinantami antygenowymi zawierającymi cytrulinę i pełnią rolę markera wczesnego okresu reumatoidalnego zapalenia stawów, natomiast ANCA są skierowane przeciw składowym cytoplazmy granulocytów obojętnochłonnych. Przy użyciu metody immunofluorescencji pośredniej wyróżnia się 3 typy ANCA: C-ANCA (*cytoplasmic* – typ cytoplazmatyczny), P-ANCA (*perinuclear* – typ okołojądrowy) oraz A-ANCA (*atypical* – atypowe). C-ANCA reagują głównie z proteinazą 3 znajdującą się w ziarnistościach azurofilnych granulocytów obojętnochłonnych. P-ANCA są skierowane głównie przeciw mieloperoksydazie, ale mogą reagować także z lizozymem, katepsyną G i innymi enzymami granulocytów. ANCA są uważane za szczególnie istotny wykładnik serologiczny zapaleń naczyń, głównie ziarniniaka Wegenera, *microscopic polyangiitis* i gwałtownie postępującego, idiopatycznego kłębuszkowego zapalenia nerek [1]. Do chwili obecnej nie określono ostatecznie częstości występowania ANCA w płynie stawowym w przebiegu RZS.

Celem pracy była ocena częstości występowania i charakterystyka przeciwciał przeciw cytoplazmie granulocytów obojętnochłonnych w płynie stawowym chorych na reumatoidalne zapalenie stawów.

## Materiał

Materiał do badań stanowiły płyny stawowe uzyskiwane od 377 chorych na reumatoidalne zapalenie stawów – w tym 81 mężczyzn i 296 kobiet, w wieku 26–67 lat (średnia wieku 47,6±3,0 lata). Rozpoznanie choroby ustalono na podstawie kryteriów Amerykańskiego Towarzystwa Reumatologicznego z 1987 r. [2]. Czas trwania choroby wynosił od 9 mies. do 10 lat. U żadnej z badanych osób nie stwierdzono cech zapalenia naczyń w postaci owrzodzeń skóry, wybroczyn, zawałów okołopaznokciowych, martwicy w obrębie paliczek, neuropatii, czy cech zapalenia naczyń w obrębie narządów wewnętrznych. Wszyscy chorzy otrzymywali niesteroidowe leki przeciwzapalne oraz leki modyfikujące przebieg reumatoidalnego zapalenia stawów (metotreksat, sulfasalazynę, sole złota lub chlorochinę).

Kliniczną charakterystykę chorych przedstawiono w tab. I.

Grupę kontrolną stanowiło 183 chorych ze zmianami zwyrodnieniowymi. Do grupy tej należało 65 mężczyzn i 118 kobiet w wieku 47–65 lat, średnia wieku 56,7±3,1 roku. Rozpoznanie choroby ustalono na podstawie kryteriów Amerykańskiego Towarzystwa Reumatologicznego [3]. Czas trwania choroby wynosił 5–20 lat. Osoby należące do grupy kontrolnej zostały poddane badaniu podmiotowemu i przedmiotowemu, nie stwierdzono u nich cech zapalenia naczyń ani chorób układowych.

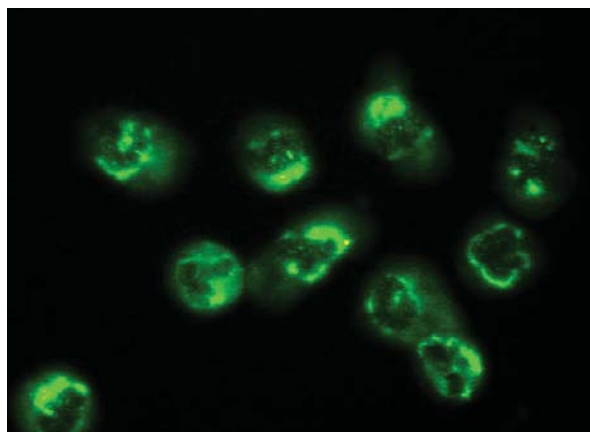
Żaden z chorych nie otrzymywał glikokortykosteroidów dostawowo przez 3 mies. przed pobraniem płynu stawowego.

## Metody

Uzyskane do badań płyny stawowe poddano ocenie typu i miana ANCA metodą immunofluorescencji pośredniej, natomiast swoistość ANCA oceniano metodą ELISA. Badane płyny stawowe poddano także ocenie obecności i miana przeciwciał przeciwjądrowych, granulocytospecyficznych ANA oraz czynnika reumatoidalnego.

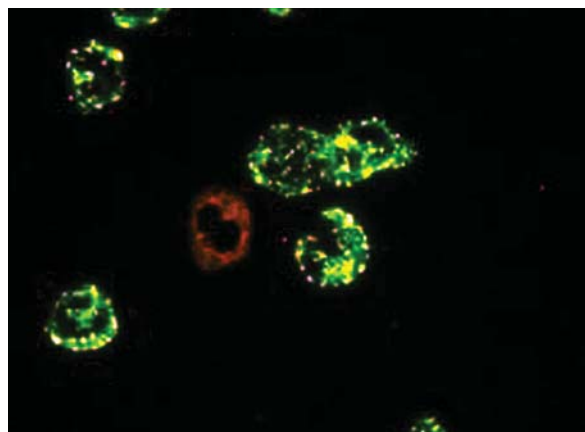
**Tabela I.** Charakterystyka grupy badanej  
*Table I.* Characteristics of patient groups

Grupa	RZS <24 mies.	RZS >24 mies.
liczba chorych (n)	114	263
płeć (M/K)	24/90	57/206
średni wiek chorych (lata) [zakres wieku]	40,6±3,5 [26–64]	51,5±2,5 [37–67]
średni czas trwania choroby (lata)	1,3±0,24	8,3±0,95



**Ryc. 1.** Przeciwciała przeciw cytoplazmie granulocytów obojętnochłonnych – typ okołojądrowy (P-ANCA).

**Fig. 1.** Perinuclear pattern of ANCA (P-ANCA).



**Ryc. 2.** Przeciwciała przeciw cytoplazmie granulocytów obojętnochłonnych – atypowa fluorescencja (A-ANCA).

**Fig. 2.** Atypical pattern of ANCA (A-ANCA).

#### Ocena ANCA przy użyciu metody immunofluorescencji pośredniej [4]

Na preparaty granulocytów obojętnochłonnych, utrwalonych alkoholem etylowym i aldehydem mrówkowym, oraz komórki linii HEp-2 nakładano badane płyny stawowe rozcieńczone w stosunku geometrycznym w PBS. Całość inkubowano w komorze wilgotnej w temperaturze pokojowej przez 30 min. Następnie preparaty przepłukiwano i nakładano króliczą immunoglobulinę znakowaną izotiocyanianem fluoresceiny skierowaną przeciw ludzkiej IgG, przeciw IgM oraz przeciw IgA. Całość inkubowano przez 30 min, po czym przepłukiwano i zamykano szkiełkiem nakrywkowym. Tak przygotowane preparaty oceniano w mikroskopie fluorescencyjnym (Axioscop-2, Zeiss, Niemcy) w obiektywie immersyjnym x100. Za wynik dodatni przyjmowano obecność ANCA w mianie powyżej 1/80.

#### Ocena swoistości antygenowej przy użyciu metody immunoenzymatycznej ELISA [5]

Do oceny swoistości antygenowej ANCA użyto antygenów komercyjnych, dostarczonych w odpowiednich stężeniach. Wykorzystano proteinazę 3–0,7 µg/ml, mieloperoksydazę 0,5 µg/ml, elastazę 10 ng/ml, laktoferynę 10 µg/ml, lizozym 1 µg/ml i katepsynę G 2 µg/ml. Mikro płytki (Maxisorp immuno plates, Nunc) optaszczano 100 µl antygenem na studzienkę, rozpuszczonego w buforze optaszczającym i inkubowano przez noc w temperaturze pokojowej. Następnie trzykrotnie przepłukiwano buforem płuczącym i pozostawiano do wyschnięcia, po czym szczelnie zamykano i przechowywano w temperaturze 4°C do czasu badania. Badane płyny stawowe rozcieńczano w buforze do inkubacji i nakładano po 100 µl na studzienkę. Ślepą próbę stanowił bufor do inkubacji. Całość pozostawiano na 60 min w temperaturze po-

**Tabela II.** Wartości miana ANCA w płynie stawowym w zależności od typu przeciwciał i czasu trwania choroby  
**Table II.** ANCA titers according to immunofluorescence pattern and disease duration

Czas trwania choroby (miesiące)	Typ ANCA	Miano			
		1/40	1/80	1/160	1/320
RZS <24	P-ANCA (n=22)	0	16 (72,7%)	6 (27,%)	0
	A-ANCA (n=4)	0	4 (100%)	0	0
RZS >24	P-ANCA (n=65)	15 (23%)	13 (20%)	21 (32,4%)	16 (24,6%)
	A-ANCA (n=17)	4 (23,5%)	13 (76,5%)	0	0

**Tabela III.** Swoistość antygenowa ANCA w płynie stawowym w zależności od typu przeciwciał i czasu trwania choroby**Table III.** Target specificities of ANCA according to immunofluorescence pattern and disease duration

Czas trwania choroby (miesiące)	Typ ANCA	Antygen					
		PR-3	MPO	LF	LZ	KG	EL
RZS <24	P-ANCA (n=20)	0	8 (40%)	12 (60%)	0	0	0
	A-ANCA (n=4)	0	0	0	1 (25%)	3 (75%)	0
RZS >24	P-ANCA (n=61)	0	12 (19,8%)	33 (54%)	0	8 (13,1%)	8 (13,1%)
	A-ANCA (n=17)	0	0	0	9 (52,9%)	8 (47,1%)	0

EL – elastaza, KG – katepsyna G, LF – laktoferyna, LZ – lizozym, MPO – mieloperoksydaza, PR-3 – proteinaza 3

kojowej, ponownie przepłukiwano i nakładano po 100 µl króliczej immunoglobuliny, znakowanej fosfatazą zasadową skierowaną przeciw ludzkiej IgG, przeciw IgM i przeciw IgA, lub mysiej immunoglobuliny, znakowanej fosfatazą zasadową skierowaną przeciw podklasom IgG1-IgG4. Po 60 min inkubacji w temperaturze pokojowej preparat trzykrotnie przepłukiwano i nakładano 100 µl PNP (fosforan przeciwnitrofenolowy). Ponownie inkubowano przez 60 min i odczytywano absorbancję przy długości fali 405 nm przy użyciu czytnika ELISA (Microplate Reader, ELX-800, USA).

Ocena swoistości ANCA była potwierdzona przy użyciu komercyjnego zestawu ANCA profile (Euroimmun, Niemcy).

### Obecność i miano innych autoprzeciwciał

Oceny obecności i miana czynnika reumatoidalnego dokonywano przy użyciu odczynu wiązania lateksu oraz odczynu Waalera-Rose [6], natomiast ocenę obecności i miana przeciwciał przeciwjądrowych (ANA) oraz przeciwciał przeciwjądrowych swoiście reagujących z jądrem granulocytów obojętnochłonnych (GS-ANA) doko-

nywano z wykorzystaniem metody immunofluorescencji pośredniej.

### Obliczenia statystyczne

Analiza statystyczna uzyskanych wyników obejmowała obliczenia średniej arytmetycznej, odchylenia standardowego, błędu standardowego średniej arytmetycznej. Różnice między rozkładem dwóch grup oceniano testem Manna-Whitneya. Współczynnik korelacji wyznaczono testem rank Spearmana. Za poziom ufności przyjęto  $p < 0,05$ . Przy analizie statystycznej korzystano z programu Statistica 5.1.

### Wyniki

#### Przeciwciała przeciw cytoplazmie granulocytów obojętnochłonnych w płynie stawowym

Postępując się metodą immunofluorescencji pośredniej, obecność ANCA w płynie stawowym wykazano u 108/377 chorych na reumatoidalne zapalenie stawów, co stanowiło 28,6% badanych. U osób we wcze-

**Tabela IV.** Charakterystyka klasy i podklasy immunoglobulin w zależności od typu ANCA**Table IV.** Characteristics of ANCA immunoglobulin class and subclass according to immunofluorescence pattern

Czas trwania choroby (miesiące)	Typ ANCA	Klasa/podklasa Ig				
		IgM	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
RZS <24	P-ANCA (n=20)	6	5	2	5	2
	A-ANCA (n=4)	3	1	0	0	0
RZS >24	P-ANCA (n=61)	9	16	6	21	9
	A-ANCA (n=17)	7	7	0	1	2

Ig – immunoglobulina

**Tabela V.** Charakterystyka klasy i podklasy immunoglobulin ANCA w zależności od swoistości antygenowej  
**Table V.** Characteristics of ANCA immunoglobulin class and subclass according to antigenic specificities

Czas trwania choroby (miesiące)	Klasa/podklasa Ig	Antygen					
		PR-0	MPO	LF	LZ	KG	EL
RZS < 24	IgM	–	0/8	6/12	1/1	2/3	–
	IgG1	–	3/8	2/12	0/1	1/3	–
	IgG2	–	1/8	1/12	0/1	0/3	–
	IgG3	–	3/8	2/12	0/1	0/3	–
	IgG4	–	1/8	1/12	0/1	0/3	–
RZS > 24	IgM	–	0/12	4/33	3/9	6/16	3/8
	IgG1	–	6/12	8/33	4/9	4/16	1/8
	IgG2	–	0/12	4/33	0/9	1/16	1/8
	IgG3	–	4/12	14/33	1/9	2/16	1/8
	IgG4	–	2/12	3/33	1/9	3/16	2/8

EL – elastaza, Ig – immunoglobulina, KG – katepsyna G, LF – laktoferyna, LZ – lizozym, MPO – mieloperoxydaza, PR-3 – proteinaza 3

snym okresie choroby (RZS <24) ANCA były obecne w 26/114 (22,8%) przypadków, natomiast w grupie chorych z dłuższym czasem trwania choroby (RZS >24) przeciwciała te wykryto u 82/263 badanych, co stanowiło 31,2%. Uzyskane wyniki nie wykazywały statystycznie znamiennej różnicy ( $p > 0,05$ ). W grupie kontrolnej ANCA wykryto u 2/183 badanych (1,09%).

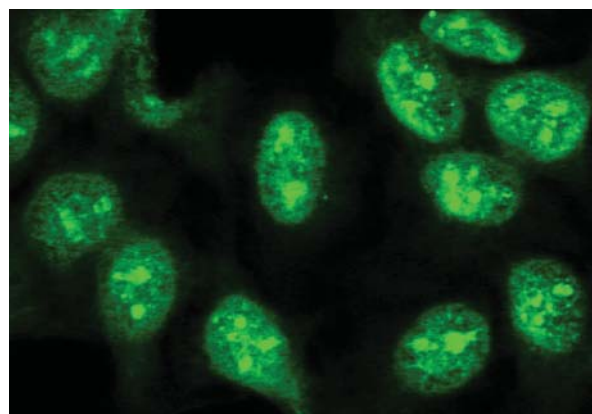
W badanych płynach stawowych stwierdzano okołojądrowe (P-ANCA) (ryc. 1.) i atypowe (A-ANCA) świecenie przeciwciał (ryc. 2.). P-ANCA wykazano u 87/108 (80,5%) badanych, A-ANCA w 21/108 (19,4%) przypadków. Uzyskane wyniki wykazywały statystycznie znamiennej różnicę ( $p < 0,001$ ). U chorych z wczesnym okre-

sem reumatoidalnego zapalenia stawów P-ANCA stwierdzono u 22/26 (84,6%), a A-ANCA u 4/26 (15,3%) badanych. U chorych z dłuższym czasem trwania choroby P-ANCA wykazano u 65/82 (79,3%), A-ANCA zaś u 17/82 badanych, co stanowiło 20,7% przypadków. Nie było statystycznej istotnej różnicy pomiędzy częstością występowania poszczególnych typów ANCA a czasem trwania choroby. ANCA, których obecność obserwowano u 2 chorych z grupy kontrolnej, wykazywały okołojądrowy typ świecenia (P-ANCA). W żadnym z badanych płynów stawowych nie stwierdzono cytoplazmatycznego typu świecenia (C-ANCA).

Jednocześnie z określeniem typu ANCA oceniano ich miano. Za dodatni wynik ANCA przyjmowano miano powyżej  $>1/20$ . Miano ANCA 1/40 wykazano w 19/108 (17,6 %) przypadków, miano 1/80 w 46/108 (42,6%), a 1/160 w 27/108 (25%), natomiast miano 1/320 w 16/108, co stanowiło 14,8% badanych płynów. ANCA w mianie 1/80 stwierdzono u 20/26 (76,9%) badanych u chorych we wczesnym okresie RZS (tab. II). U 2 chorych z grupy kontrolnej miano ANCA wynosiło 1/40.

### Swoistość antygenowa, klasy i podklasy immunoglobulin

Postępując się metodą ELISA, oceniono swoistość antygenową ANCA. W 6 przypadkach ANCA stwierdzanych w metodzie immunofluorescencji pośredniej nie wykazano żadnej swoistości antygenowej. Były to przeciwciała o okołojądrowym typie świecenia (P-ANCA). W 2 przypadkach wykryto je w płynach chorych z wczesnym RZS,



**Ryc. 3.** Przeciwciała przeciwjądrowe – plamisty typ fluorescencji.

**Fig. 3.** Speckled pattern of antinuclear antibodies.

**Tabela VI.** Wartości miana IgM RF w płynach stawowych ANCA+**Table VI.** *Titers of rheumatoid factor in ANCA positive patients*

Czas trwania choroby	Typ ANCA	Miano czynnika reumatoidalnego				
		1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280
RZS <24	P-ANCA (n=20)	11	4	3	–	–
	A-ANCA (n=4)	–	–	–	–	–
RZS >24	P-ANCA (n=61)	20	20	15	9	1
	A-ANCA (n=17)	9	6	2	–	–

w 4 zaś z długotrwałym procesem choroby. W płynach tych jednocześnie z ANCA wykazano obecność przeciwciał przeciwjądrowych. Metoda ELISA pomogła więc zweryfikować rzeczywistą liczbę ANCA+ płynów stawowych, uznano bowiem, że wynik badania immunofluorescencyjnego w tych 6 płynach był fałszywie dodatni. Przyjęto zatem, że ANCA były obecne w 102/377 płynach stawowych, co stanowiło 27% badanych.

W 20/102 (19,6 %) przypadków ANCA reagowały z mieloperoksydazą. W 45/102, co stanowiło 44,1% ANCA+ płynów, reagowały one swoiście z laktoferyną, natomiast w 10/102 przypadkach ANCA wykazywały swoistość w stosunku do lizozymu, co stanowiło 9,8% ANCA+ płynów stawowych. W 19/102 (18,6%) badanych płynach przeciwciała te reagowały swoiście z katepsyną G, dotyczyło to głównie płynów pochodzących od chorych z długotrwałym procesem zapalnym. W 8/102 (7,8 %) przypadki ANCA wykazywały swoistość w stosunku do elastazy. Wykazano także statystycznie znamienne częstsze występowanie ANCA reagujących swoiście z laktoferyną w porównaniu z innymi antygenami ( $p < 0,05$ ). W żadnym przypadku ANCA nie wykazywały swoistości dla proteinazy 3, natomiast w płynach stawowych pochodzących od chorych we wczesnym okresie choroby nie stwierdzono obecności ANCA reagujących swoiście z elastazą (tab. III).

W 2 badanych płynach stawowych z grupy kontrolnej nie wykazano żadnej swoistości antygenowej ANCA.

Jednocześnie z oceną swoistości określano klasę i podklasę immunoglobulin, do których należały przeciwciała przeciw cytoplazmie granulocytów obojętnochłonnych. ANCA w klasie IgM obserwowano u 25/102 badanych, co stanowiło 24,5% przypadków. W 75% ANCA występowały w klasie IgG. Obserwowano je w podklasie IgG1 u 29/77 badanych, co stanowiło 37,6%, i podklasie IgG3 u 27/77 badanych, co stanowiło 35,1% (tab. IV).

Przeciwciała przeciw cytoplazmie granulocytów obojętnochłonnych reagujące swoiście z mieloperoksydazą występowały w klasie IgG. W 9/20 przypadków

(45%) ANCA stwierdzono podklasę IgG1, a w 7/20 (35%) IgG3. W żadnym przypadku nie obserwowano ANCA w klasie IgM reagujących swoiście z mieloperoksydazą. Obecność ANCA reagujących swoiście z laktoferyną w klasie IgM stwierdzono w 10/45 (22,2%) płynów, a w klasie IgG w 36/45 (80%). W 17/36 przypadków (47,2%) wykryto je w podklasie IgG3, a w 10/36 (27,8%) w podklasie IgG1. ANCA skierowane przeciwko lizozymowi obserwowano w klasie IgM w 4/10 (40%) płynów, a w IgG 6/10 (60%). Występowały one w podklasie IgG1 w 4/6, co stanowiło 66,7% ANCA IgG. Przeciwciała reagujące z katepsyną G obserwowano w klasie IgM w 8/19 (42,1%), a w klasie IgG w 11/19 (57,9%) przypadków. Należały one głównie do podklasy IgG1 w 5/11 (45,5%) płynów. ANCA w klasie IgM skierowane przeciwko elastazie wykryto w 3/8 (37,5%) płynów, pozostałe zaś w klasie IgG w 5/8, co stanowiło 62,5% (tab. V). Wykazano statystycznie znamienne częstsze ( $p < 0,05$ ) występowanie ANCA w klasie IgG, głównie w podklasie IgG1i IgG3, w porównaniu z klasą IgM.

### Obecność innych autoprzeciwciał

Czynnik reumatoidalny w klasie IgM (IgM RF) stwierdzono w 300/377 (79,6%) badanych płynów. Był on obecny w 37/114 (32,4%) płynów pochodzących od chorych z wczesnym RZS i 263/263 (100%) płynów pochodzących od chorych z dłuższym czasem trwania choroby. RF stwierdzono w 100/102 (98%) płynów stawowych, w których wykazano obecność ANCA. Okołojądrowy typ świecenia (P-ANCA) obserwowano u 83/100, co stanowiło (83%) płynów z obecnym czynnikiem reumatoidalnym, A-ANCA zaś wykazano w 17/100 (17%) płynów RF+. Pochodziły one głównie od chorych z długotrwałym przebiegiem RZS. RF nie wykazano w żadnym z płynów stawowych, w których wykryto A-ANCA, pochodzących od chorych we wczesnym okresie choroby. Wartości te były statystycznie znamienne ( $p < 0,05$ ). U żadnego chorego z grupy kontrolnej nie wykazano obecności czynnika reumatoidalnego w płynie stawowym.

Określano również miano czynnika reumatoidalnego. Za wynik dodatni w odczynie wiązania lateksu uważano miano powyżej 1/40. Najczęściej obserwowano miano 1/80, które wykazano u 40/102 (39,2%) badanych. W tab. V zamieszczono wartości miana dla poszczególnych grup w zależności od czasu trwania choroby i typu ANCA.

Przeciwciała przeciwjądrowe wykryto w 24/377 (6,4%) płynów stawowych chorych na RZS. Obserwowano je w 8/114 (7%) płynów pobranych od chorych z wczesnym okresem choroby i w 16/263 (6,1%) z długotrwałym przebiegiem RZS. Wykazywały one plamisty typ świecenia (ryc. 3).

Jednoczesne występowanie ANCA i ANA stwierdzono w 2/26 (7,69%) badanych płynach stawowych pochodzących od osób z wczesnym okresem choroby. Ich miano w obu przypadkach wynosiło 1/40, natomiast w płynach, w których wykazano obecność ANCA, pochodzących od osób z długotrwałym przebiegiem choroby, ANA były obecne w 5/82 (6,1%) przypadkach, a ich miano kształtowało się w zakresie od 1/80 do 1/320. Nie wykazano istotnej statystycznie korelacji między mianem i typem ANCA a mianem ANA ( $p > 0,05$ ). U żadnego chorego z grupy kontrolnej nie wykazano obecności ANA w płynie stawowym. U nikogo także, zarówno z grupy badanej, jak i kontrolnej, nie stwierdzono w płynie stawowym obecności przeciwciał przeciwko jądom granulocytów obojętnochłonnych (GS-ANA).

## Dyskusja

Obecność ANCA w surowicy chorych na reumatoidalne zapalenie stawów oceniło wielu badaczy [7-10], natomiast ich obecność w płynie stawowym była przedmiotem badań nielicznych autorów [11, 12]. W niniejszej pracy wykazano, że ANCA są obecne w 27% badanych płynów stawowych. Obserwowano je w 22,8% płynów uzyskanych od chorych z wczesnym okresem RZS i w 31,2% od osób z wieloletnim czasem trwania choroby. Tę wyższą, choć nieznamienią statystycznie, częstość występowania ANCA w płynie stawowym chorych o długim przebiegu RZS można tłumaczyć stałą stymulacją antygenami pochodzącymi z granulocytów, które w przeważającej liczbie występują w płynie stawowym o charakterze zapalnym. Mulder i wsp. [12] wykazali obecność ANCA w płynach stawowych 6 chorych. Wyższa częstość ANCA w płynach stawowych, wykazana przez tych autorów, mogła wynikać z małej grupy badanej (6 chorych). Analiza 377 płynów przeprowadzona w niniejszej pracy pozwoliła na dokonanie szczegółowej charakterystyki wykrytych w nich ANCA. Najczęściej stwierdzany, bo w 80,5% badanych płynów, był okołojądrowy typ świecenia ANCA. A-ANCA były obec-

ne stosunkowo rzadko, bo w 19,5% badanych płynów. Częstość występowania poszczególnych typów ANCA w płynie stawowym i surowicy krwi jest podobna [10]. Można więc przyjąć, że dominującym typem ANCA u chorych na RZS jest świecenie okołojądrowe. Niemniej jednak atypowe ANCA, obserwowane także w przebiegu tej choroby, mogą być dowodem na stymulację przez różne, a nie przez jeden określony antygen komórek syntetyzujących ANCA.

Średnia wartość miana ANCA w płynie stawowym wynosiła 1/80 i była podobna do wartości uzyskanych w surowicy krwi [10]. Miano to wykazywano szczególnie u chorych we wczesnym okresie choroby, co być może jest związane ze stymulacją antygenową na początku choroby i wytworzeniem przeciwciał, które dopiero w miarę jej trwania są produkowane w większej liczbie. Kolejnym etapem badań było określenie swoistości ANCA obecnych w płynach stawowych. Wykazano, że ANCA najczęściej, czyli w 44,1%, reagowały swoiście z laktoferryną. Miały one ponadto swoistość dla mieloperoksydazy w 19,6%, dla lizozymu w 9,8%, katepsyny G w 18,6% i dla elastazy w 7,8% badanych płynów. Wyniki te są podobne do uzyskanych w badaniach surowic chorych na RZS. Potwierdzają one obserwacje dokonane przez Afeltra i wsp. [11]. Podobnie jak we wcześniejszych doniesieniach ANCA stwierdzane w przebiegu RZS wykazywały głównie swoistość dla laktoferryny [12, 13]. Vittecoq i wsp. [14] uważają, że z uwagi na brak standaryzacji ELISA w ocenie przeciwciał przeciw laktoferrynie należy ostrożnie interpretować uzyskane wyniki. Potwierdzają to obserwacje własne. Często okazuje się, że komercyjne zestawy do oznaczania LF-ANCA są zanieczyszczone innymi antygenami [15]. W obecnych wynikach interesujące jest to, że ANCA reagujące z mieloperoksydazą wykazano częściej w płynie stawowym niż w surowicy krwi [10]. Wskazuje to na możliwość syntezy MPO-ANCA w obrębie jamy stawowej jako efekt aktywacji granulocytów obojętnochłonnych, w wyniku której dochodzi do uwolnienia mieloperoksydazy – enzymu mającego istotne znaczenie w metabolizmie tlenowym aktywowanych komórek. Przy omawianiu ANCA o swoistości dla mieloperoksydazy należy pamiętać o możliwości ich reakcji krzyżowych z przeciwciałami przeciw tyreoperoksydazie (TPO). W badaniach Cambrige i wsp. [16] wykazano, że przeciwciała przeciw TPO reagowały z mieloperoksydazą, co wywoływało okołojądrowy typ świecenia w metodzie immunofluorescencji pośredniej. Ciekawy jest fakt, że w tych badaniach MPO-ANCA pochodzące od chorych z rozpoznaniem *vasculitis* nie reagowały z TPO. Autorzy uważają, że pojawienie się MPO-ANCA w przypadkach, w których nie spodziewano się tego typu autoprzeciwciał, może wynikać właśnie z takiej reakcji krzyżowej. W niniejszej pracy nie badano obec-

ności przeciwciał przeciw tyreoperoksydazie, a w grupie badanej nie stwierdzono cech chorób autoimmunologicznych gruczołu tarczowego, trudno zatem odnieść się do spostrzeżeń autorów. Obecności ANCA o swoistości dla elastazy nie obserwowano w płynach pochodzących od chorych we wczesnym okresie choroby. Pojawiły się one natomiast w płynach uzyskanych od osób z wieloletnim czasem trwania RZS. Fakt ten można tłumaczyć tym, że elastaza nie jest enzymem dominującym w ziarnistościach granulocytów obojętnochłonnych, a zatem do jej pojawienia się prawdopodobnie predysponuje: przewlekłe zapalenie i ciągła aktywacja komórek uwalniających enzymy w procesie fagocytozy, stymulacja PMN przez immunoglobulinę, a także ich apoptoza. Staje się ona następnie autoantygenu. Hipoteza ta wymaga jednak potwierdzenia z doborem odpowiedniej grupy chorych. W badanych płynach stawowych nie wykazano obecności ANCA o swoistości dla proteiny 3. Jest to zgodne z obserwacjami innych autorów [17]. ANCA o swoistości dla proteiny 3 występują głównie u chorych z ziarniniakiem Wegenera. Niezmiernie rzadko spostrzega się je w innych zapaleniach naczyń [18, 19]. Wykrycie ich u chorych na przewlekłe choroby zapalne wynikało prawdopodobnie z zanieczyszczeń innymi antygenami, co mogło prowadzić do uzyskania fałszywie dodatnich wyników.

W pracy ocenie poddano klasy i podklasy immunoglobulin ANCA obecnych w płynie stawowym. Wykazano, że występują one w 24,5% w klasie IgM, co jest wartością wyższą w porównaniu z ANCA obserwowanymi w surowicy krwi (7,5%) [10]. Tłumaczyć to można faktem wcześniejszej syntezy ANCA w obrębie zmienionej zapalnie jamy stawowej w przebiegu choroby. Ekspozycja antygenów pochodzących z PMN prowadzi do syntezy początkowo IgM ANCA, w późniejszym okresie IgG ANCA. Przeciwciała w klasie IgG wykazano w 75% badanych płynów, co w porównaniu z surowicami, gdzie obecne były w 92,% jest wartością niższą. Występowały one w podklasach IgG1 i IgG3, jednak proporcje ich były nieco zmienione na korzyść IgG3. Nie stwierdzono MPO-ANCA w klasie IgM. Można to tłumaczyć stymulacją MPO zachodzącą wcześniej w rozwoju choroby, co mogło nastąpić w fazie nacieków zapalnych w błonie maziowej. Jednak są to jedynie przypuszczenia. Wyjaśnienie ich wymaga zebrania grupy chorych składającej się z osób z nawracającym zapaleniem stawów we wczesnym okresie choroby, okresowego pobierania płynu stawowego i poszukiwania w nim obecności ANCA oraz charakterystyki klasy immunoglobulin. W badaniu autorów nie przeprowadzono takich obserwacji, nie dokonano ich również poprzednio.

Jednocześnie z oceną ANCA poszukiwano innych auto-przeciwciał, szczególnie czynnika reumatoidalnego, przeciwciał przeciwjądrowych i GS-ANA. Obecność czynnika

reumatoidalnego wykazano w 92,6% płynów stawowych, w których były także obecne ANCA. W 83% przypadków były to P-ANCA. W płynach, w których obecne były A-ANCA, czynnik reumatoidalny obserwowano u 17%.

Jednoczesne występowanie ANCA i ANA w płynach stawowych wykazano u 7,69% badanych, co było porównywalne z wynikami uzyskanymi w badanych surowicach, gdzie współwystępowanie ANCA i ANA obserwowano w 6,25% przypadków. Podobne wyniki uzyskali Afeltra i wsp.[11], którzy tłumaczą brak korelacji niezależną odpowiedzią immunologiczną w stosunku do antygenów jądrowych i enzymów PMN, natomiast Rother i wsp. [20] obserwowali ANA częściej, bo u 59% ANCA+ chorych na RZS w porównaniu z 23% osób ANCA-. Autorzy ci wykazali także, że miano ANA było wyższe w grupie ANCA+. Wyniki te jednak nie wykazywały statystycznie istotnych różnic.

### Piśmiennictwo

1. Falk RJ, Jennette JC. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Eng J Med* 1988; 318: 1651-7.
2. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 315-24.
3. Altman R, Asch E, Bloch G. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis: classification of osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* 1986; 29: 1039-49.
4. Wiik A. Delineation of a standard procedure for indirect immunofluorescence detection of ANCA. *APMIS* 1989; 97: 12-3.
5. Wiik A, Rasmussen N, Wislander J. Methods to detect autoantibodies to neutrophilic granulocytes. In: *Manual of biological markers of disease*. A9,1-14. Kluwer Academic Publishers, 1994.
6. Zimmermann-Górska I, Białkowska-Puszczewicz G, Puszczewicz M. Atlas płynu stawowego. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1995.
7. Abad E, Carbonell M, Tural C, et al. ANCA antibodies in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 1993; 93: 46-51.
8. Bosch X, Liena J, Collado A, et al. Occurrence of antineutrophil cytoplasmic and antineutrophil (peri) nuclear antibodies in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1995; 22: 2038-45.
9. Braun M, Csernok E, Schmitt WH, et al. Incidence, target antigens, and clinical implications of antineutrophil cytoplasmic antibodies in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1996; 23: 826-30.
10. Puszczewicz M. Przeciwciała przeciw cytoplazmie granulocytów obojętnochłonnych u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów. *Reumatologia* 2006; 44: 119-27.
11. Afeltra A, Sebastiani GD, Galeazzi M, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in synovial fluid and in serum of patients with rheumatoid arthritis and other types of synovitis. *J Rheumatol* 1996; 23: 10-5.
12. Mulder AH, Horst G, van Leeuwen MA, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 1054-6.



13. Mustila A, Paimela L, Leirisalo-Repo M, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with early rheumatoid arthritis: an early marker of progressive disease. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1371-7.
14. Vittecoq O, Jouen-Beades F, Krzanowska K, et al. Prospective evaluation of the frequency and clinical significance of antineutrophil cytoplasmic and anticardiolipin antibodies in community cases of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2000; 39: 481-9.
15. Audrain MA, Baranger AR, Lockwood CM, et al. High immunoreactivity of lactoferrin contaminating commercially purified myeloperoxidase. *J Immunol Method* 1994, 176: 23-31.
16. Cambridge G, Williams M, Leaker B, et al. Anti-myeloperoxidase antibodies in patients with rheumatoid arthritis: prevalence, clinical correlates, and IgG subclass. *Ann Rheum Dis* 1994; 53: 24-9.
17. Guang LS. ANCA in RA patients. *Br J Rheumatol* 1996; 35: 1328-9.
18. Gross WL, Schmitt WH, Csernok E. Antineutrophil cytoplasmic autoantibody –associated diseases: A rheumatologist's prospective. *Am J Kidney Dis* 1991; 18: 175-9.
19. Guillemin L, Cohen P, Gayraud M, et al. Churg-Strauss syndrome. Clinical study and long-term follow-up of 96 patients. *Medicine* 1999; 78: 26-37.
20. Rother E, Schochat TH, Peter HH. Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in rheumatoid arthritis: a prospective study. *Rheumatol Int* 1996; 15: 231-7.