



«Антинуклеарные антитела»

Лапин Сергей Владимирович

Лаборатория диагностики
аутоиммунных заболеваний
СПбГМУ им.акад.И.П.Павлова

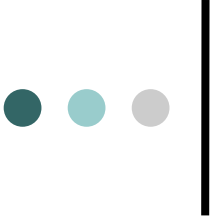




Иммунопатогенез системных ревматических заболеваний

Причина возникновения неизвестна...

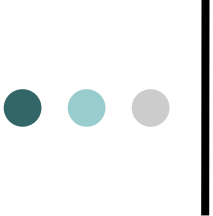
- Выраженный иммуно-воспалительный компонент схожий с системным ответом при хронических инфекциях
- При ДБСТ в разной мере отмечается поражение сосудов с развитием васкулита или васкулопатии
- Иммунный ответ направлен на множество внутриклеточных и внеклеточных антигенных мишеней – **антинуклеарные антитела**



Антинуклеарные антитела (АНА)

Представляют собой семейство аутоантител, реагирующих с нуклеиновыми кислотами и ассоциированными с ними белками

Семейство включает более 200 рибонуклеопротеиновых белков

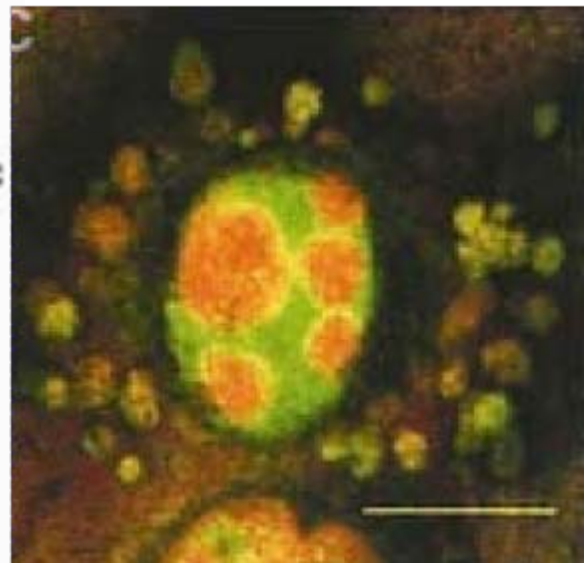


Краткий перечень состояний, сопровождающихся АНА

Нозологическая форма	%
Системная красная волчанка	95
Диффузная склеродермия	95
Синдром Шегрена	95
Дерматомиозит	40
Смешанное заболевание соединительной ткани	100
Дискоидная КВ	50
Ревматоидный артрит	30
Юношеский РА (олигоартикулярный)	90
Аутоиммунный гепатит	95
Первичный билиарный цирроз	95
Злокачественные заболевания	20
Пожилые лица	15
Здоровые женщины	3

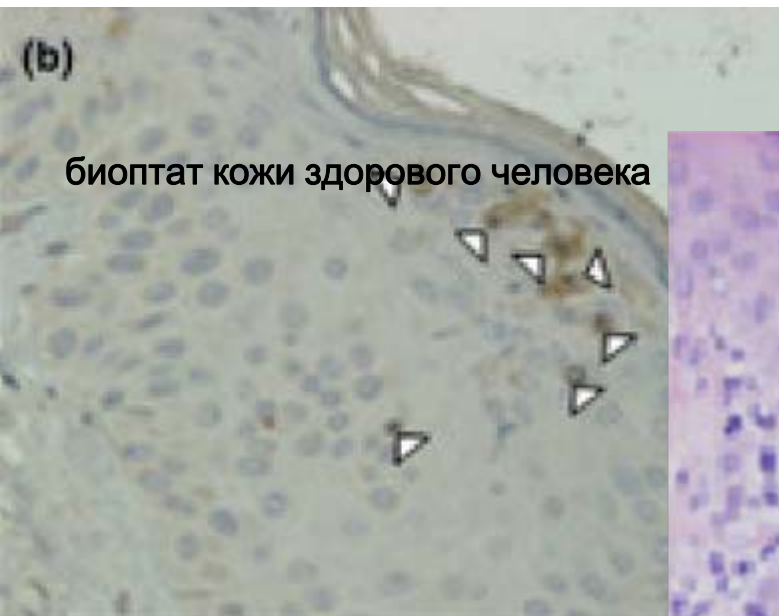
Антигены антинуклеарных антител в составе апоптотических телец

Clustering of Autoantigens in Apoptotic Surface Structures

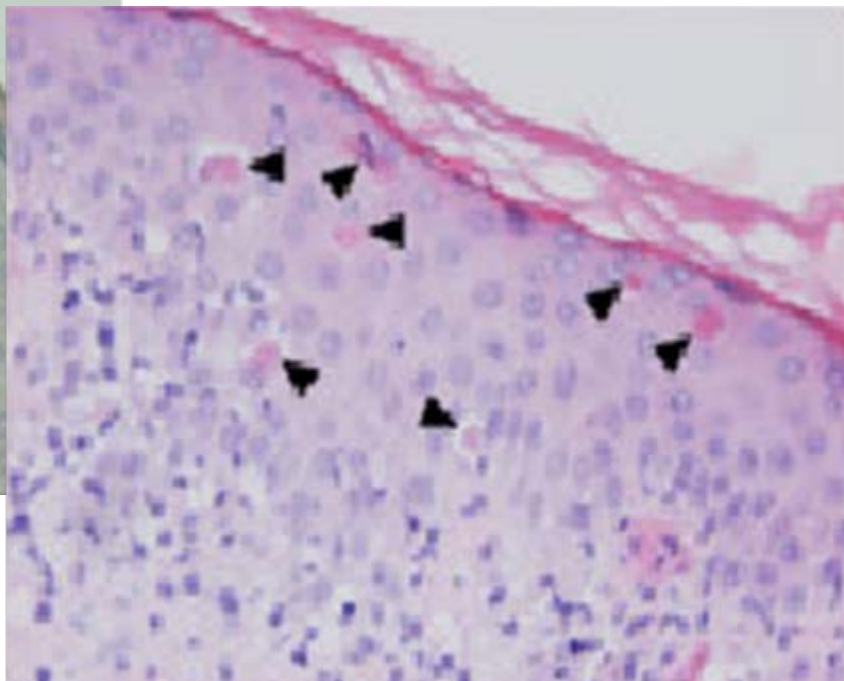


L. A. Casciola-Rosen et al. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J. Exp. Med.* 1994 Apr 1; 179(4): 1317-1330

Исследование апоптоза кератиноцитов у здоровых лиц и больных СКВ по действию УФО

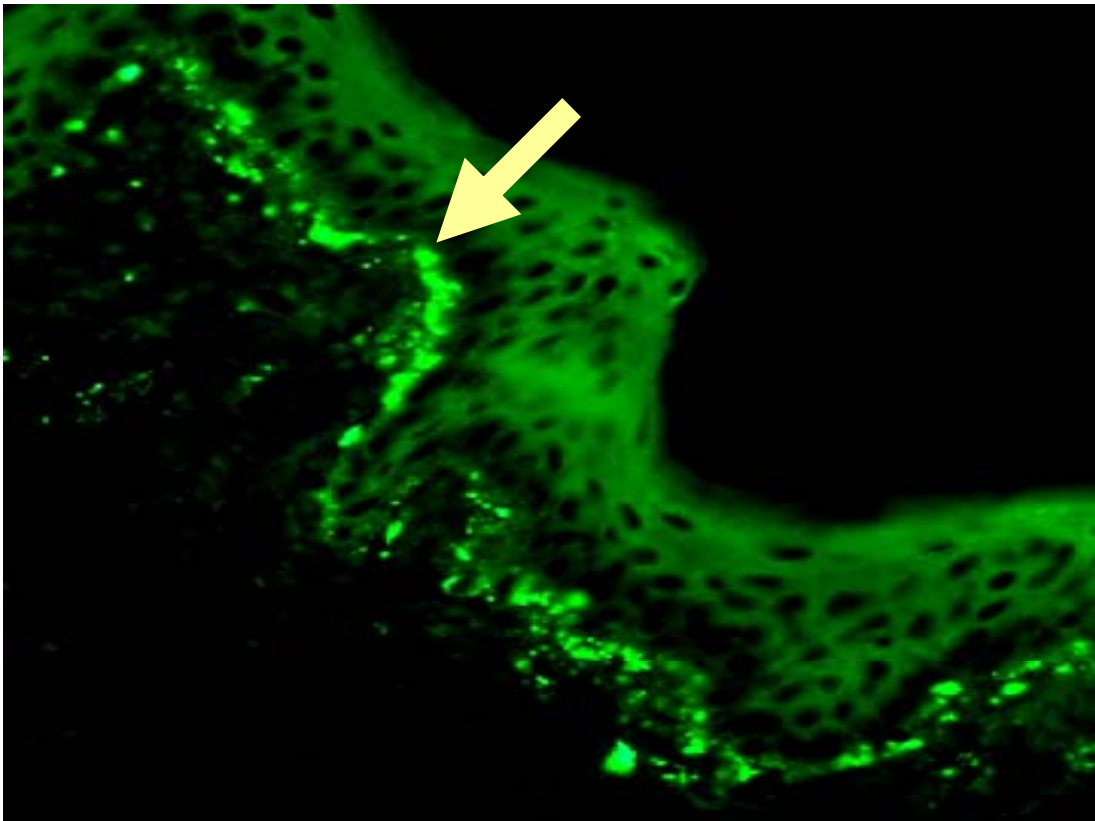


биоптат кожи пациента СКВ



Is disturbed clearance of apoptotic keratinocytes responsible for UVB-induced inflammatory skin lesions in systemic lupus erythematosus? E. Reefman et al., *Arthritis Res Ther.* 2006; 8(6): R156.

Отложения иммунных комплексов *in vivo*
под базальной мембраной кожи при СКВ
(волчаночная полоска)

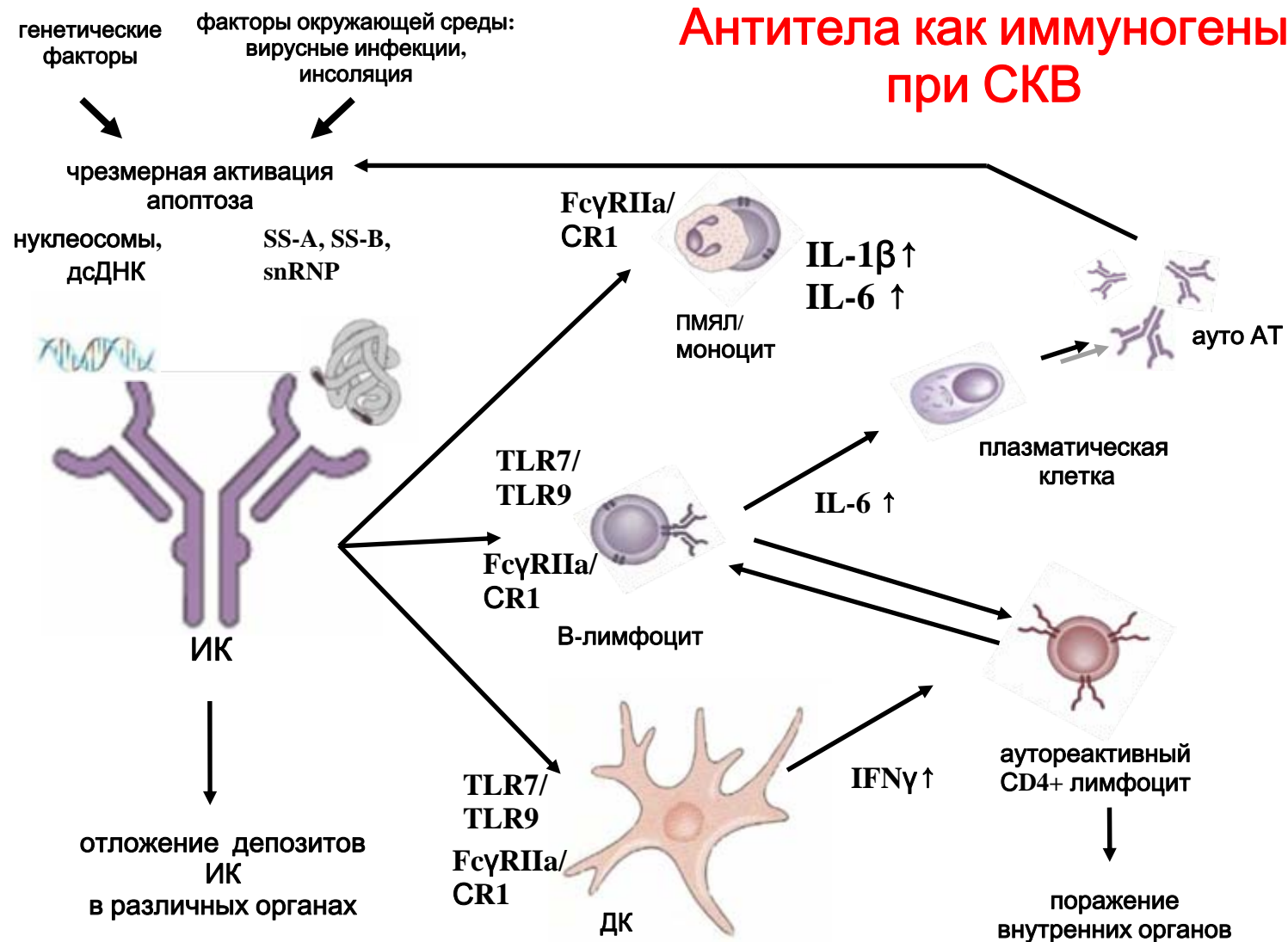




Механизмы агрессии антител

- Формирование иммунного комплекса с отложением в стенке сосуда (напр. почке) с развитием местного воспаления
- Цитотоксичность (напр. цитопении)
- Связывание антител с белками сыворотки (напр. АФС)
- Проникновение антител в клетку (???)
частое обнаружение АНА *in vivo*

Антитела как иммуногены при СКВ





История вопроса:

- Начало XX века — «гиалиновые тельца» в цитоплазме лейкоцитов
- 1948 год Hargraves, Richmond, Morton — метод обнаружения LE-клеток in vitro
- 1951 год Lee, Michael, Vural — обнаружили сывороточный фактор, стимулирующий фагоцитоз ядер лимфоцитов лейкоцитами периферической крови
- 1957 год Holoborow, Weir, Johnson - использовали нРИФ(Coons 1950) - и выявили АНФ на криосрезях печени человека
- 1961 год Векс — использовал ткани лабораторных животных
- 1982 год Тап — использовал перевиваемую клеточную линию человека HEp-2
- 1958 год Jones — обнаружил фактор из крови больных СШ преципитирующий экстракты ядер клеток

Классификация и номенклатура

- АНА — семейство из 100 типов аутоантител
- «Антинуклеарный фактор» тест нРИФ, условно «АНА=АНФ»
- «Экстрагируемый ядерный антиген» - водо-растворимые компоненты ядра клетки — ранее использовался ацетонный экстракт, в настоящее время «смесь антигенов»
- Нуклеиновые кислоты водонерастворимы, в состав ЭНА не входят
- Номенклатура конкретного антитела:
 - 1. название антигена или мол.масса (snRNP70)
 - 2. фамилия больного (Sm, Ku)
 - 3. сокращение антигена/заболевания (PM-Sci)
- Локализация ядерной мишени: хроматин; рибонуклеопротеины; ядрышко; цитоплазма



Методы определения АНА

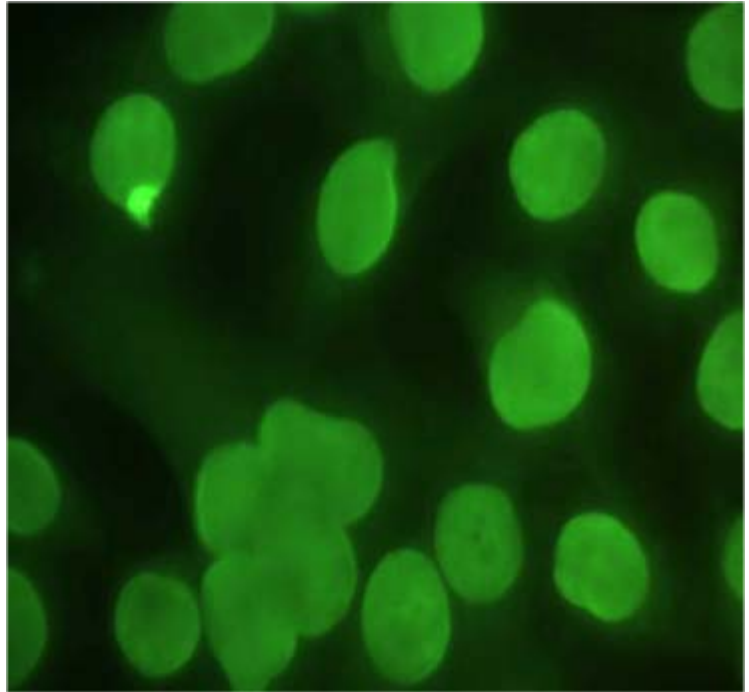
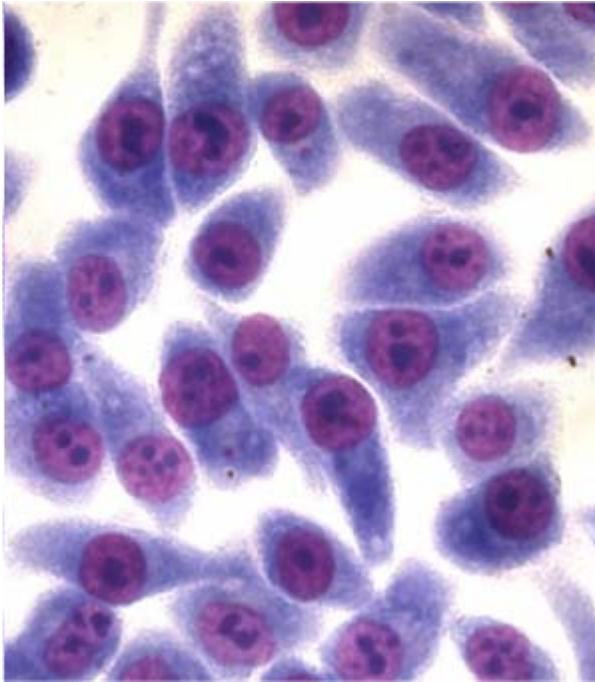
- LE- клетки
- АНФ (Нер-2) с определением титра и типа свечения
- Антитела к дсДНК и нуклеосомам
- Антитела к экстрагируемым антигенам (ИФА и лайнблот)
- Антитела к фосфолипидам

LE-клеточный феномен



- Обнаружение нейтрофилов, фагоцитировавших ядра лимфоцитов при инкубации цельной крови
- Формирование LE-клеток определяется присутствием в сыворотке антинуклеарных антител
- Метод не стандартизован, требуется 3х кратное выявление LE-клеток
- Низкая чувствительность **не позволяет рекомендовать его использование** в практической диагностике

Антинуклеарный фактор на клеточной
линии аденокарциномы гортани HEp-2





Другие субстраты для обнаружения АНФ

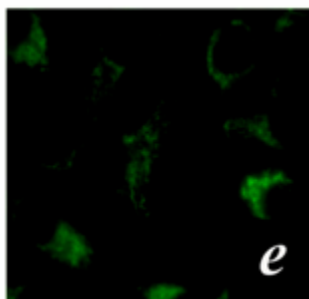
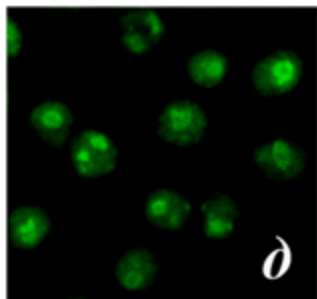
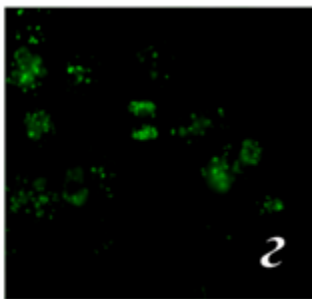
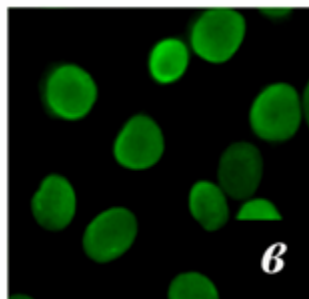
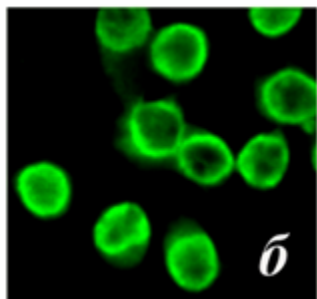
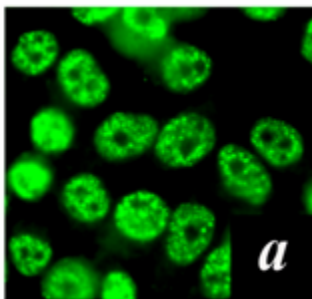
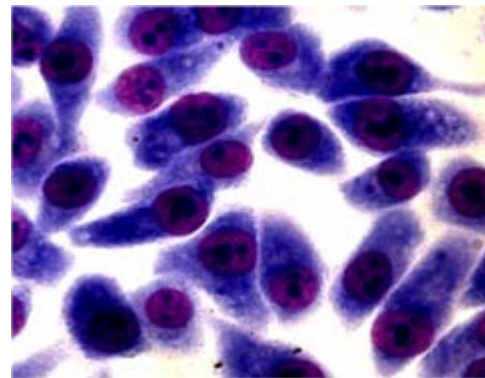
- «Мазки-отпечатки» печени мыши
- Криосрезы печени крысы
- Криосрезы печени приматов — улучшение детекции ряда антител — метод EUROIMMUN
- Клетки других эпителиоидных клеточных линий человека- HeLa
- Генетически модифицированные клетки — Hep2000-«+ген» SSA, Hep 20-10 — высокая частота делений
- Криосрезы других органов (кроме печени) — часто АНФ случайная находка при нРИФ обследовании



Титры АНФ

- шаг $\times 2$ от 1:10
- альтернативный метод титрования EUROIMMUN — 100-1000-10000, промежуток — \ln_{10} — 3,2
ткани лабораторных животных - от 1:10
- перевиваемые клеточные линии - от 1:40-1:80
- до 1:160 — низкие титры антител, могут встречаться в норме
- от 1:320 — высокие титры
- Конечный титр отражает аффинность аутоантител - оценка в крестах допустима, однако не позволяет мониторировать активность заболевания

Тип свечения ядра клетки






Типы свечения ядра клетки

ОСНОВНЫЕ

- Гомогенный (Диффузный)
 - периферический
- Гранулярный (Ячеистый)
 - мелко/крупногранулярный
- Ядрышковый
- Центромерный
- Цитоплазматический
 - рибосомальный/синтетазный
 - митохондриальный
 - цитофиламенты

РЕДКИЕ

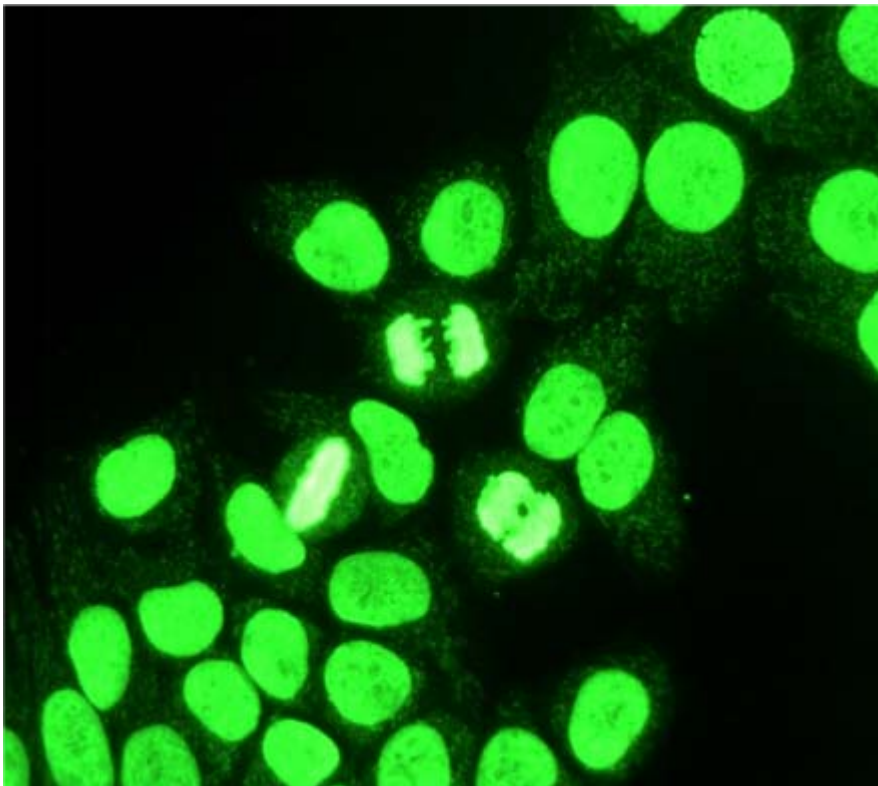
- Точки в ядре
 - несколько (few nuclear dots)
 - много (many nuclear dots)
- Антиген пролиферирующих клеток (PCNA)
- Веретено деления и центриоли



Оценка типа свечения ядра клетки

- Оценка ядер **покоящихся клеток** – свечения хроматина/гранул/ядрышек/нуклеолеммы
- Оценка ядер делящихся (**митотических**) клеток - окраска веретена деления, нуклеоплазмы

Гомогенный тип свечения

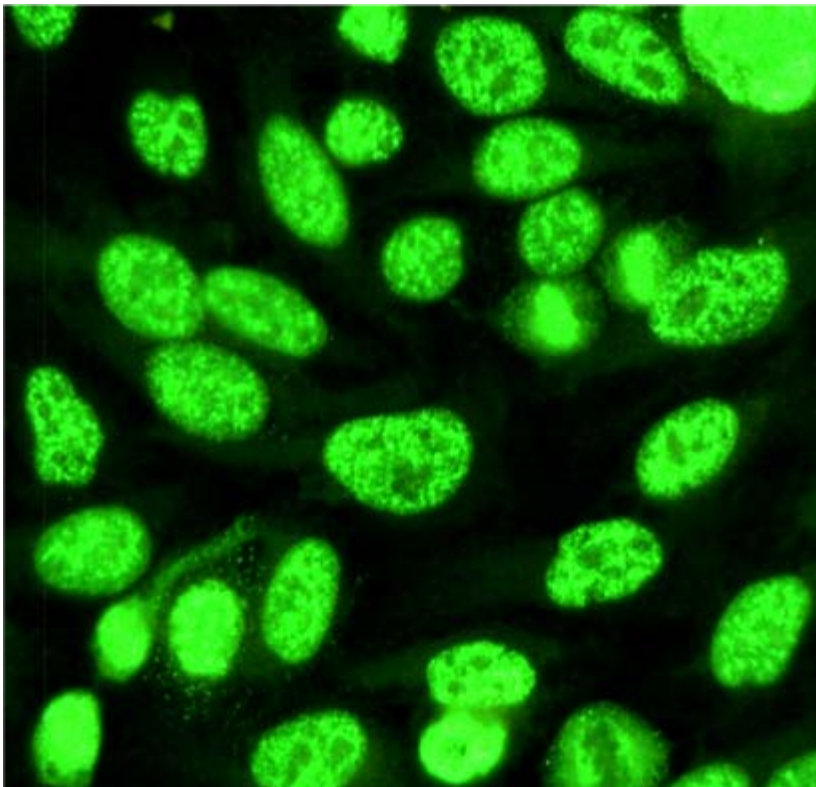


Заболевания: СКВ,
лекарственная СКВ,
аутоиммунный гепатит,
склеродермия

Основные антигены:
дсДНК 50%,
Гистоны 30%
Нуклеосомы 60%

Встречаются:
RNP/Sm 10%
SSA 60 20%
SSA 52 25%

Гранулярный тип свечения



Заболевания: кожная КВ,
СЗСТ, с. Шогрена, РА

Основные антигены:

RNP 60%

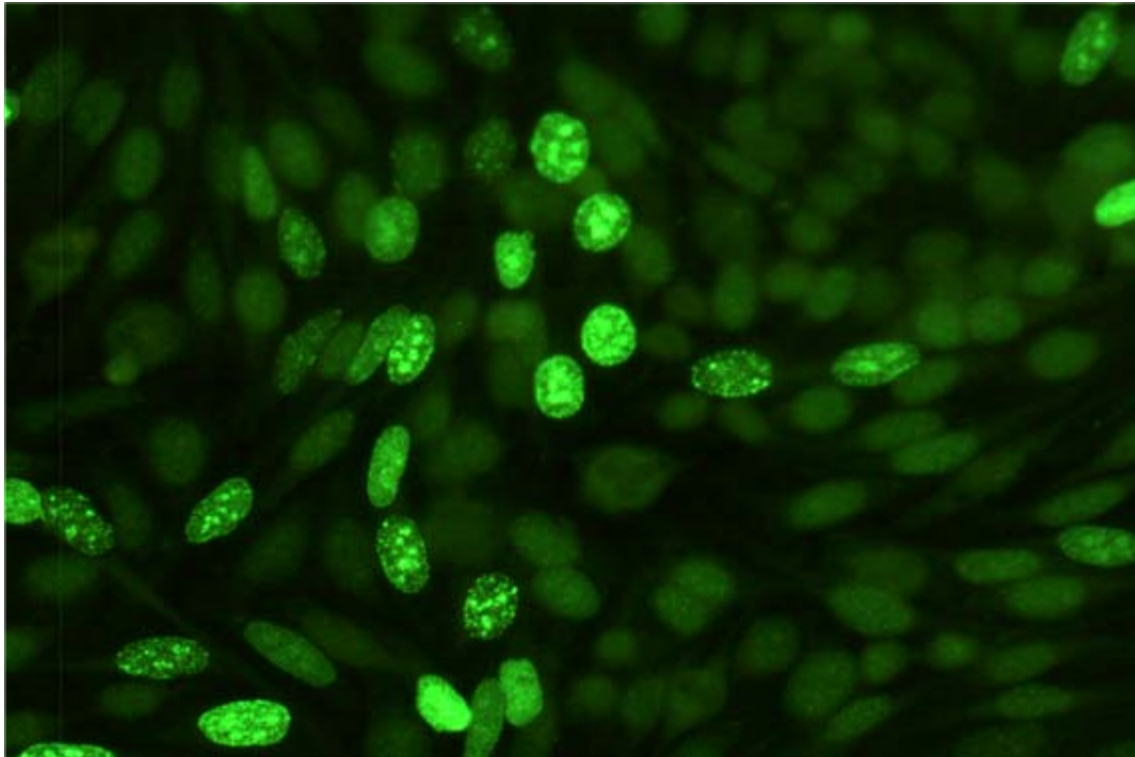
Sm 30%

SSA-60 20%

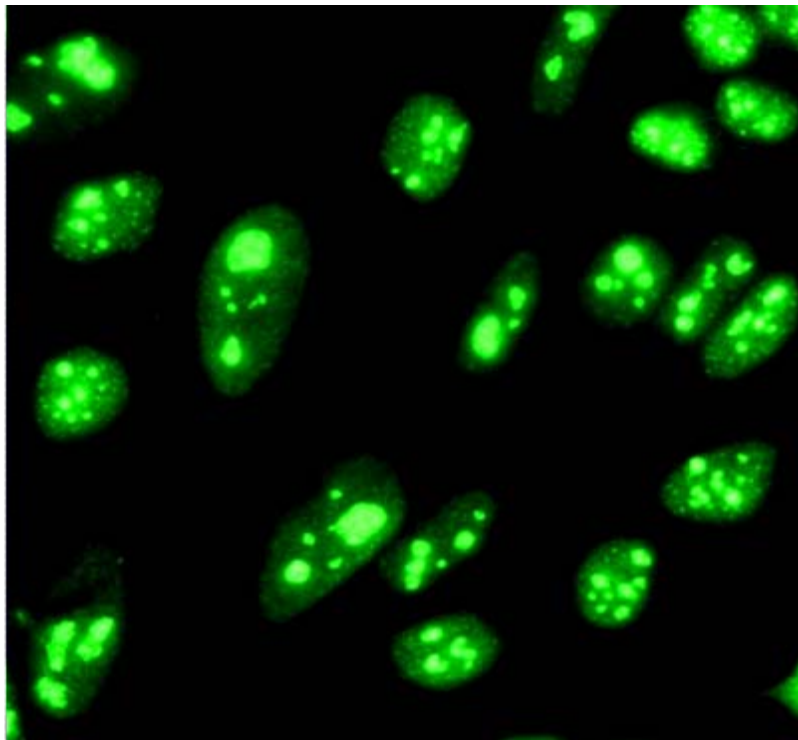
SSA-52 40%

SSB 20%

● ● ● | Антитела к антигену
пролиферирующих клеток
(PCNA-cclin - p56) - маркер СКВ



Ядрышковый тип свечения



Заболевания:
диффузная
склеродермия,
дерматомиозит

Основные
специфичности:

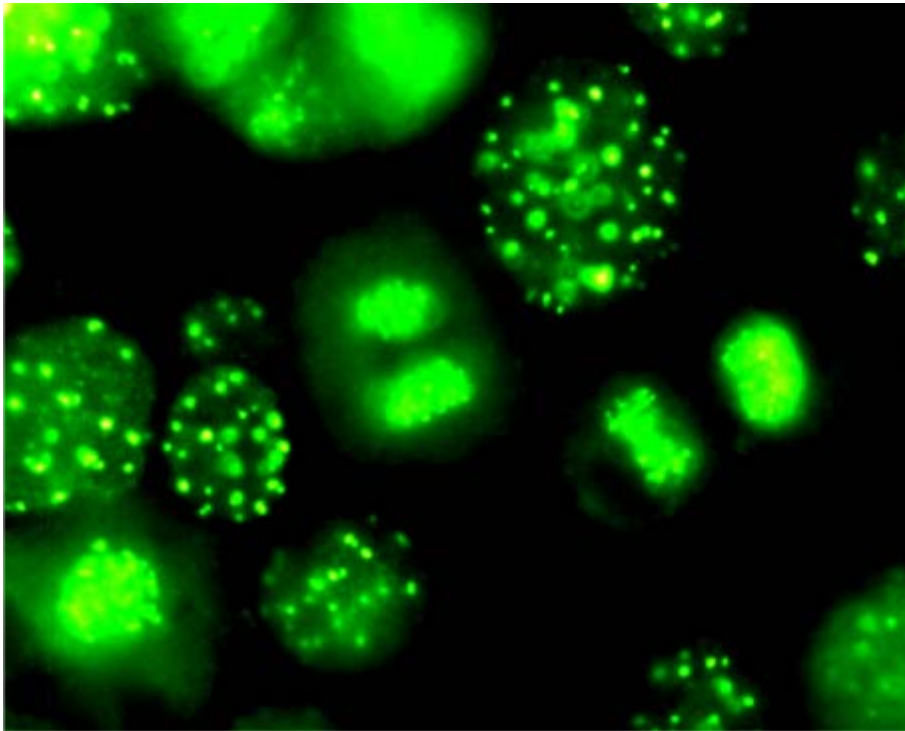
Sci70 4/10

PM-Sci 1/10

Другие:

SSA52 – 3/10

Центромерный тип свечения

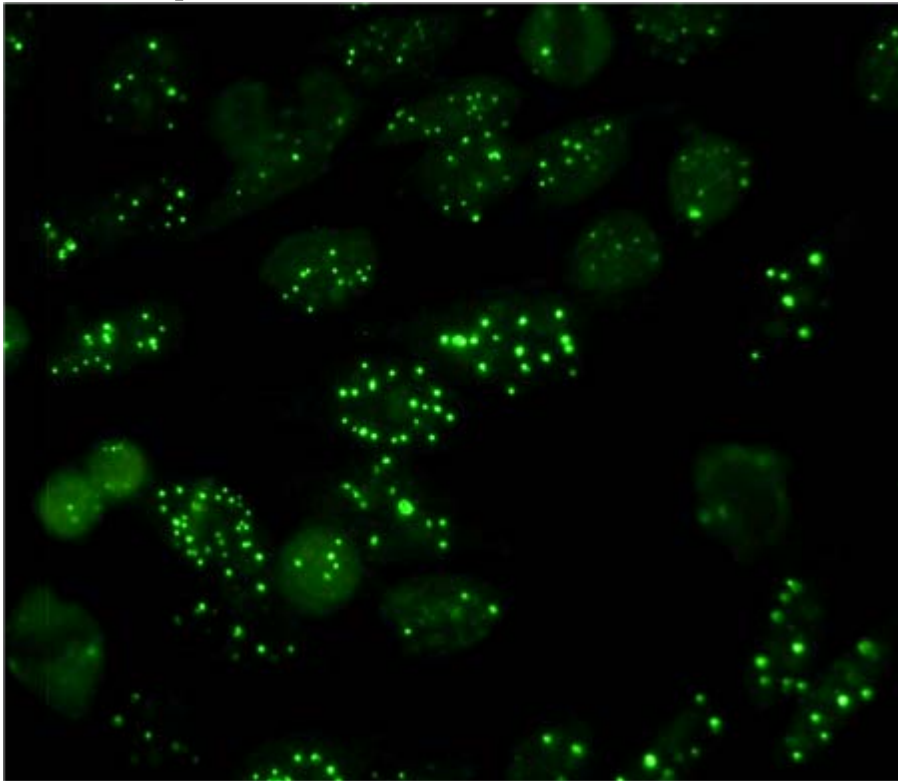


Заболевания:
диффузная
склеродермия,
CREST синдром

Основные
специфичности:
Cent B 95%
Scl70 20%

Другие:
PM-Scl 1/12
SSA 52 3/12

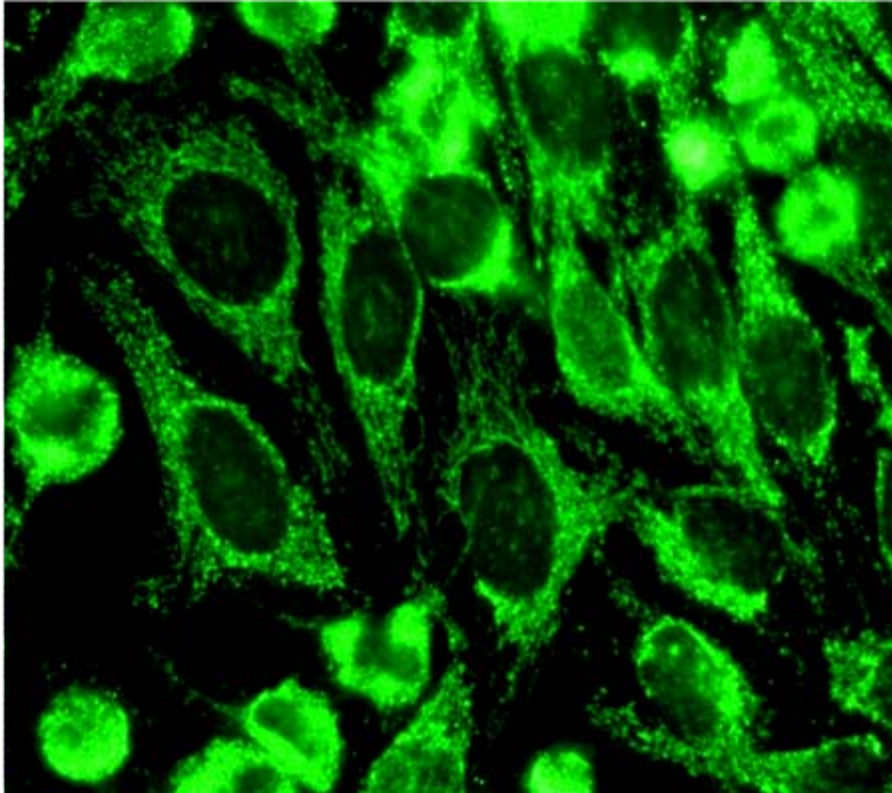
Точки в ядре (nuclear dots)



Основные
специфичности:
sp100 – 80%
PML – 30%

Наиболее часто
при
аутоиммунных
заболеваниях
печени

Цитоплазматический тип свечения



Подразделяют свечения:

- митохондрий
- цитоскелета
- органелл

Основные специфичности:

AMA M2 – 40%

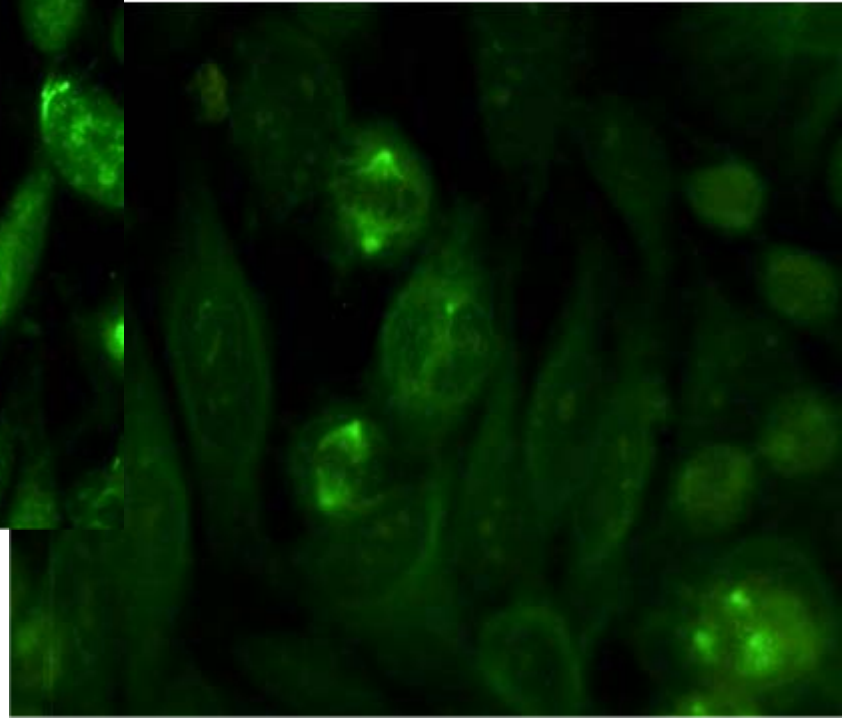
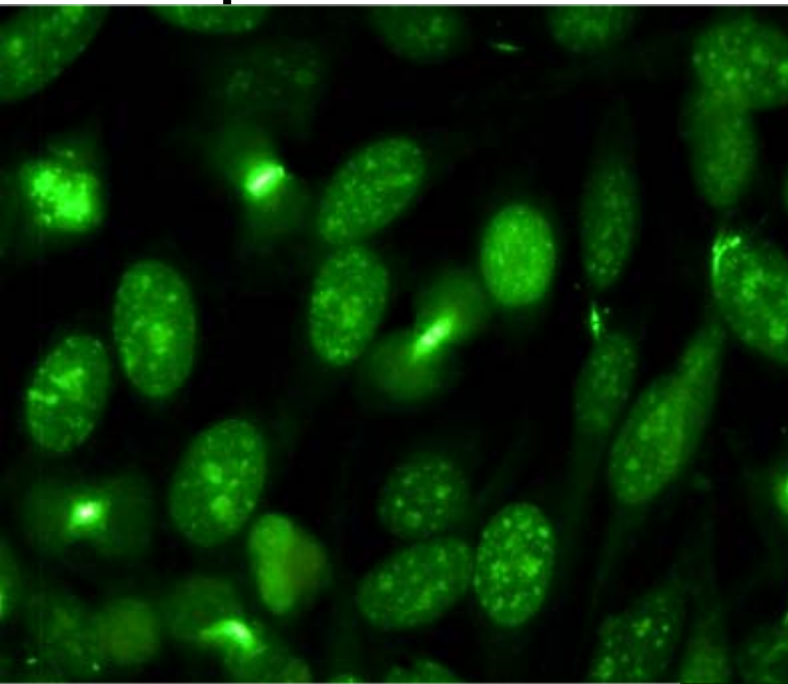
F-актин – 25%

RiboP – 20%

Jo-1 – 10%

Наиболее часто при аутоиммунных заболеваниях печени

● ● ● Веретено деления – редкие типы без самостоятельного клинического значения



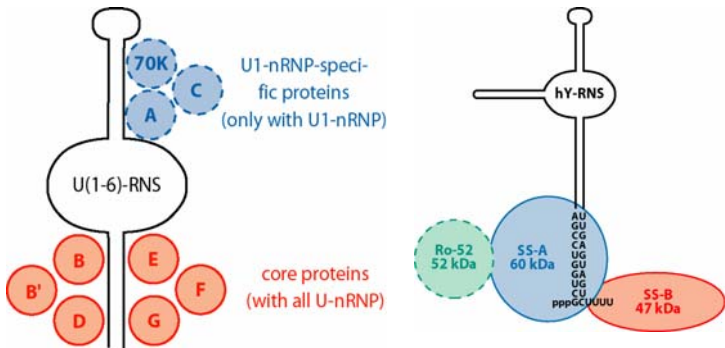
ТИП СВЕЧЕНИЯ	ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ
Гомогенный (Диффузный)	СКВ, нефрит, лекарственная волчанка склеродермия
периферический	Аутоиммунные заболевания печени
Мелкогранулярный	Неспецифичен, ревматические заболевания, ревматоидный артрит, инфекции и онкология, норма
Крупногранулярный	Смешанное заболевание соединительной ткани
Ядрышковый	Склеродермия/Полимиозит
Центромерный	Склеродермия
Цитоплазматический	Неспецифичен, за исключением митохондриальных антител
рибосомальный/синтетазный	СКВ, полимиозит
митохондриальный	Билиарный цирроз
цитофиламенты	Аутоиммунные заболевания печени
Точки в ядре (MND/FND)	Аутоиммунные заболевания печени
PCNA	СКВ, нефрит
Веретено деления/центриоли	Неспецифичены

Основные антигены антиядерных антител

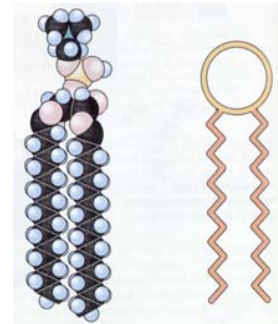


ДНК-
ассоциированные

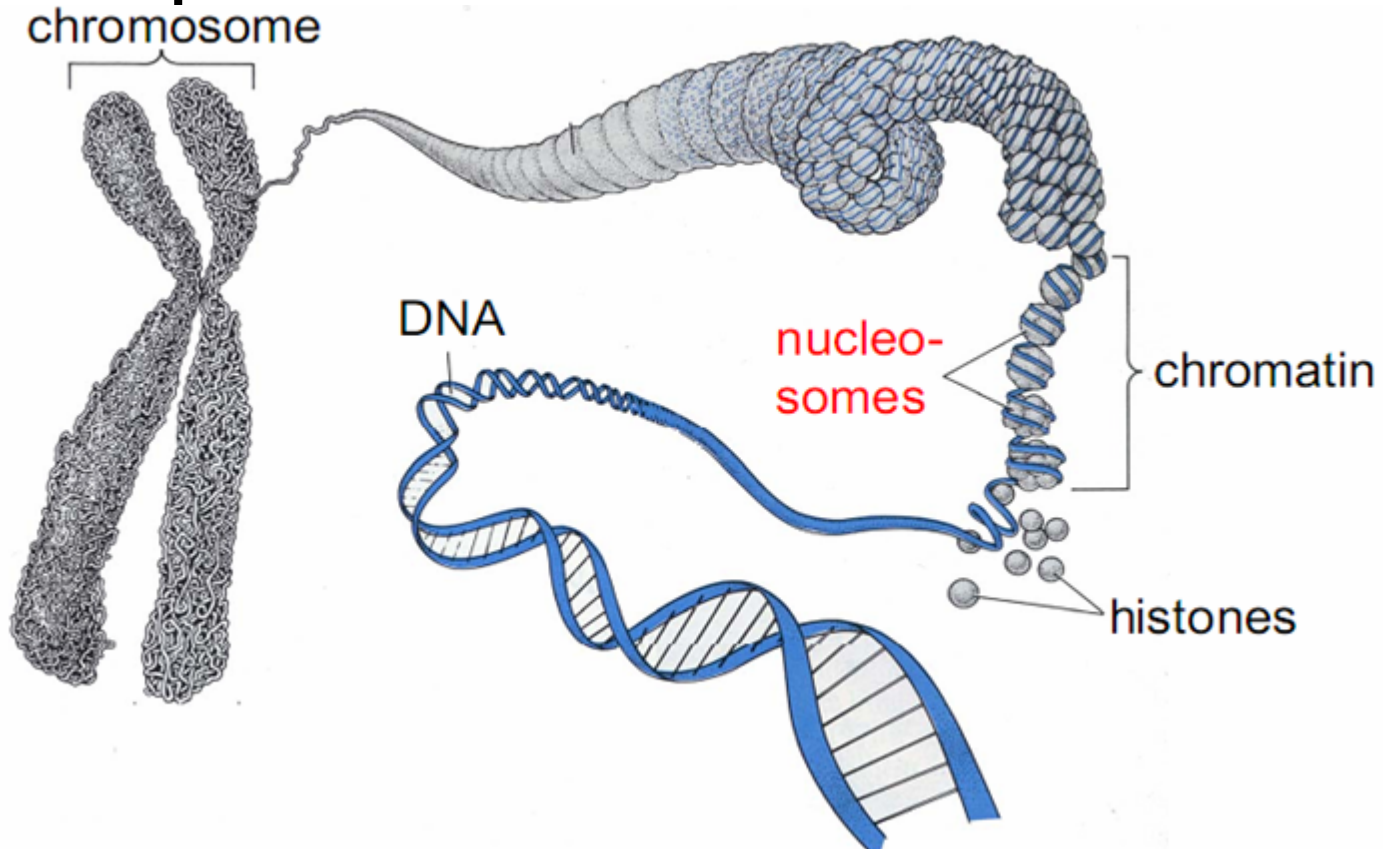
РНК-ассоциированные

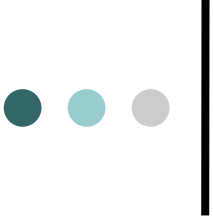


Мембрano-
ассоциированные



Антигены хроматина – гомогенный тип свечения АНФ

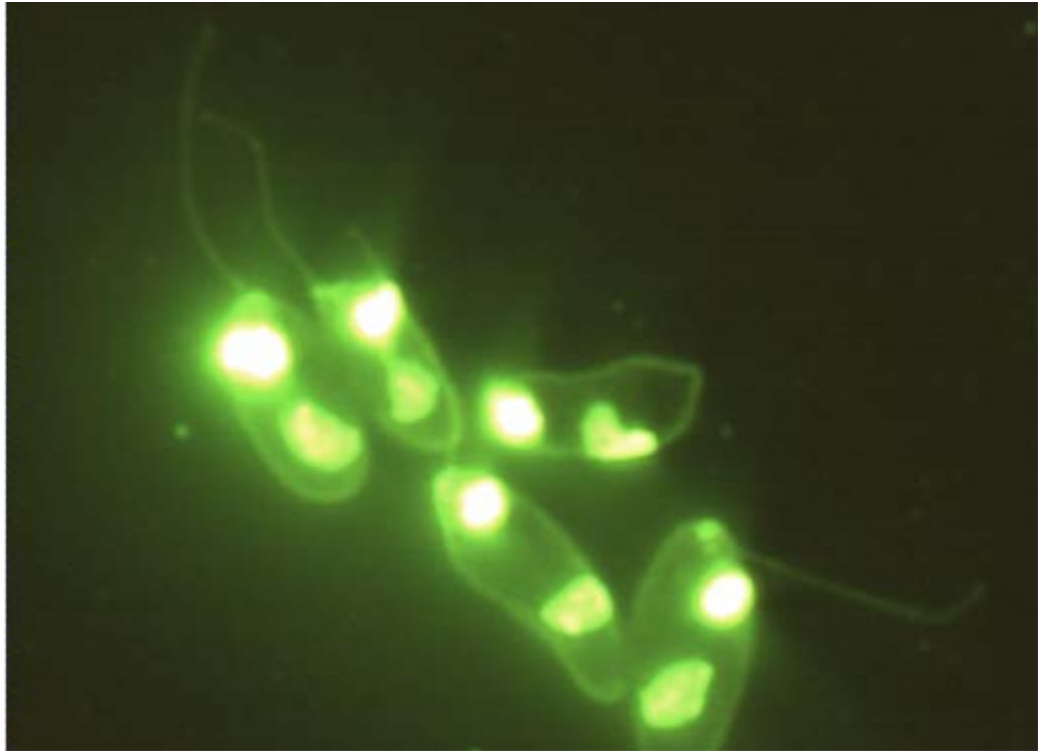





Антитела к двуспиральной ДНК

- играют роль в поражении почек при СКВ и являются ее основным серологическим маркером
- отмечаются у 30-60% больных СКВ в зависимости от специфичности тест-системы
- ДНК – “-” заряжена, плохо связывается с пластиком
- при использовании ИФА одновременно выявляются антитела к осДНК и дсДНК – ИФА тест системы отличаются между собой
- антитела к осДНК низкоспецифичны
- клиническое значение имеет определение антител класса IgG

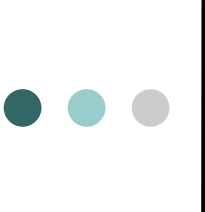
Выявление высокоаффинных
антител к дсДНК на кинетопласте
Crithidia luciliae





Антитела к гистонам и нуклеосомам

- Ядро нуклеосомы — H1, H2A/B, H3, H4 — основные мишени H1 и H2B
- Отмечаются при лекарственной волчанке, склеродермии, аутоиммунном гепатите
- При лекарственной волчанке появляются на фоне лечения и исчезают в течении 0,5 года после отмены
- Нуклеосомы представляют основную иммунологическую мишень при СКВ
- Отмечаются у 50-60% больных СКВ, очень специфичны, могут использоваться совместно с антителами к дсДНК в диагностики СКВ



Клинико-лабораторные параметры выявления анти-дсДНК и анти-НКС

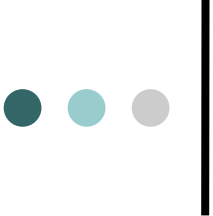
Показатель	СКВ (32) чувствительность	Контроль (61) специфичность
АНФ на Нер-2	31 (96%)	17 (72%)
Ат к дсДНК	14 (44%)	2 (97%)
Ат к НКС	17 (53%)	4 (93 %)

Сочетание ат к дсДНК и ат к НКС обладает
чувствительность 65% специфичностью 91%



Антитела к дсДНК и НКС в диагностике СКВ

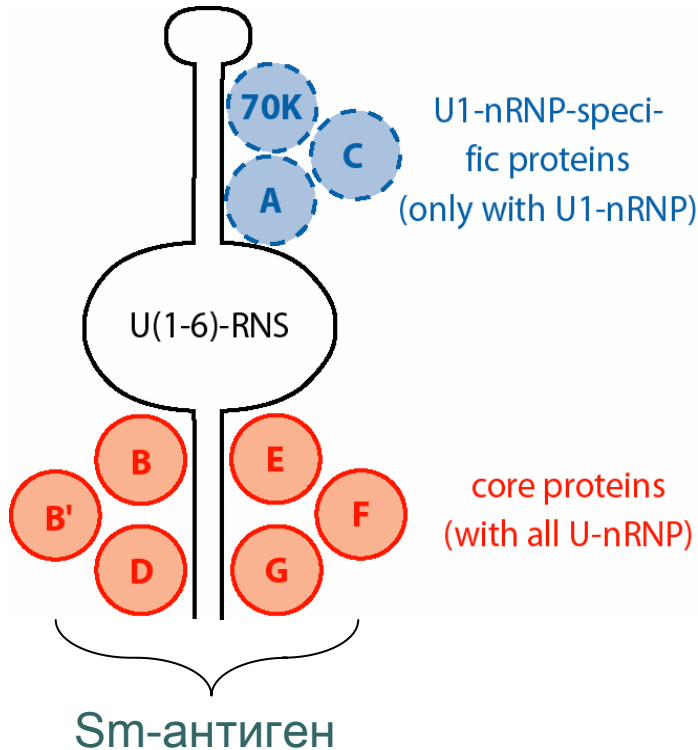
- Антитела к НКС выявлялись преимущественно у больных с поражением почек (85%) и цитопениями (75%)
- Использовать анти-НКС и анти-дсДНК для выявления больных СКВ с тяжелым течением волчанки
- Могут использоваться для диагностики СКВ при выявлении высоких титров АНФ



Антитела к экстрагируемому нуклеарному антигену — extractible nuclear antigen - ENA

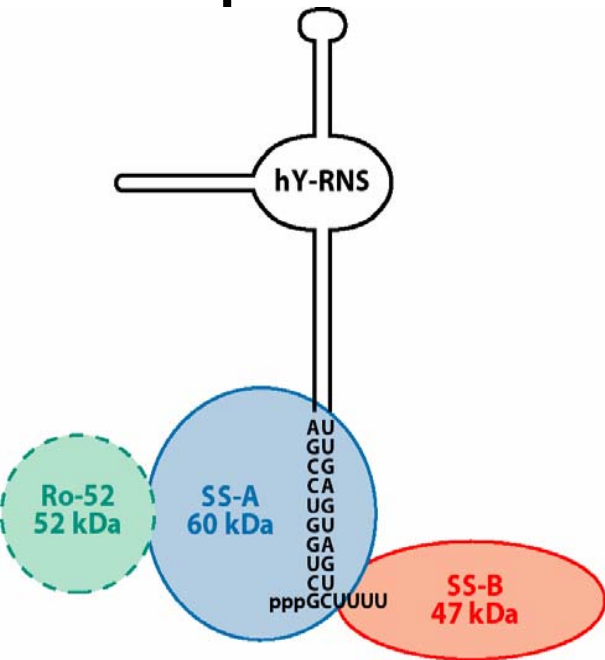
- Исторически ЭНА использовался в методе преципитации в геле для описания различных специфичностей антител
- При использовании тотального экстракта ЭНА в методе ИФА специфичность низка (много перекрестных реакций)
- В ИФА системах используют смесь очищенных/рекомбинантных антигенов (не содержит ДНК/РНК)
- Ограниченный набор обусловлен сложностью сенсibilизации ИФА планшета антигенами — разная сорбция антигенов, образование неоантигенов — низкая чувствительность и специфичность
- Обычно качественный результат - индекс
- **Изолированное определение антител к ЭНА обладает плохими параметрами для диагностики системных заболеваний – нет многих антигенов**

Антитела к рибонуклеопротеинам (RNP-Sm комплекс)



- Крупные ядерные гранулы — крупногранулярный тип свечения ядра
- Состоит из комплекса нуклеиновой кислоты (РНК) и белков, составляющих антигены RNP (U1-RNP) в оболочке и Sm — антиген в сердцевине
- Sm — встречается изолировано - **основной маркер СКВ**
- U1-RNP — встречаются совместно с Sm — **основной серологический маркер смешанного заболевания соединительной ткани**

Антитела к рибонуклеопротеинам: SSA/SSB комплекс



- Мелкогранулярный тип свечения — наиболее частый
- Антигены растворимы — утрачиваются из HEp2 клеток
- 3 антигена:
 - SSA 52 kDa — Ro 52
 - SSA 60 kDa — Ro 60
 - SSB - La
- SSA 52 — наиболее частое АНА, неспецифичный, маркер большинства аутоиммунных заболеваний
- SSA 60 — изолировано — СКВ, совместно с SSB — синдром Шегрена



Другие рибонуклеопротеины

- Scl-70 — фрагмент топоизомеразы-1 — маркер диффузной склеродермии
- CENT A,B,C - центромеры - CREST синдром
- PCNA- белок циклин p32 — маркер СКВ
- RiboP — белок рибосом— нейролюпус
- Белок Ku — белки ядерного матрикса — СКВ
- Белки ядрышка — PM-Scl, фибриллярин, NOR — склеродермия
- Jo-1 - тРНК-синтетазы — полимиозит
- Mi2 — 240 кДа белок ядра - дерматомиозит



Антифосфолипидные антитела

- **Антифосфолипидные антитела** – семейство аутоантител, направленных против отрицательно заряженных фосфолипидов клеточных мембран и их белковых кофакторов
- Антитела связываются с фосфолипидами в комплексе с **белком-кофактором** – бета2 гликопротеин, протромбин и т.д.
- Антифосфолипидные антитела появляются в ходе **апоптоза клетки**, так как при апоптозе меняется структура клеточной мембраны (градиент фосфолипидов), экспозиция фосфатидилсерина
- **Антифосфолипидный синдром** – аутоиммунное нарушение коагуляции, основная причина тромбозов у молодых, одна из ведущих причин привычного невынашивания беременности



История вопроса (1)

- 1906 год — создание реакции Вассермана (Wasserman) на основе экстракта из бычьих сердец
- 1941 год - изучен антиген экстракта: холестерин, фосфатилхолин, кардиолипин
- 1956-1970 - накопление данных о ложноположительных тестах у больных с СКВ
- 1972 год - сывороточный фактор, препятствующий свертыванию крови (Rapraport) — волчаночный антикоагулянт



История вопроса (2)

- 1983 Harris EN –разработка первых тестов для выявления АКЛА на основе РИА
- 1983 год — Graham Hughes сопоставил клинические проявления и лабораторные данные - АФС
- 1986 Первые попытки стандартизации АКЛА
- McNeil HP 1989 и 1990 – открытие белкового ко-фактора и идентификация бета2 гликопротеина
- 1999 года – публикация первых клинико-лабораторных критериев АФС (Sapporo 1998)
- 2006 год – пересмотр критериев АФС (Sydney 2005)
- 2010 год – конференция в Торонто



Патогенез АФС

- АФЛА реагируют с комплексами фосфолипидов и белков — протромбиновый комплекс – удлинение АЧТВ
- Состояние с изменением сосудисто-тромбоцитарного гемостаза и хроническим потреблением факторов коагуляции — хронический ДВС
- Тромбоз происходит на фоне обезвоживания, инфекции, венозного застоя
- АФС сопровождается нарушениями микроциркуляции — язвы кожи, микроангиопатия почек, ливедо



Функциональный тест для обнаружения АКЛА: **волчаночный антикоагулянт**

- Тест основан на удлинении частичного протромбинового времени (АЧТВ)
- **Скрининговые тесты** - АЧТВ, яд гадюки Рассела, коалиновый тест
- **Корректирующие тесты**— АЧТВ с добавлением стандартной плазмы
- **Подтверждающие тесты**— АЧТВ с избытком фосфолипидов

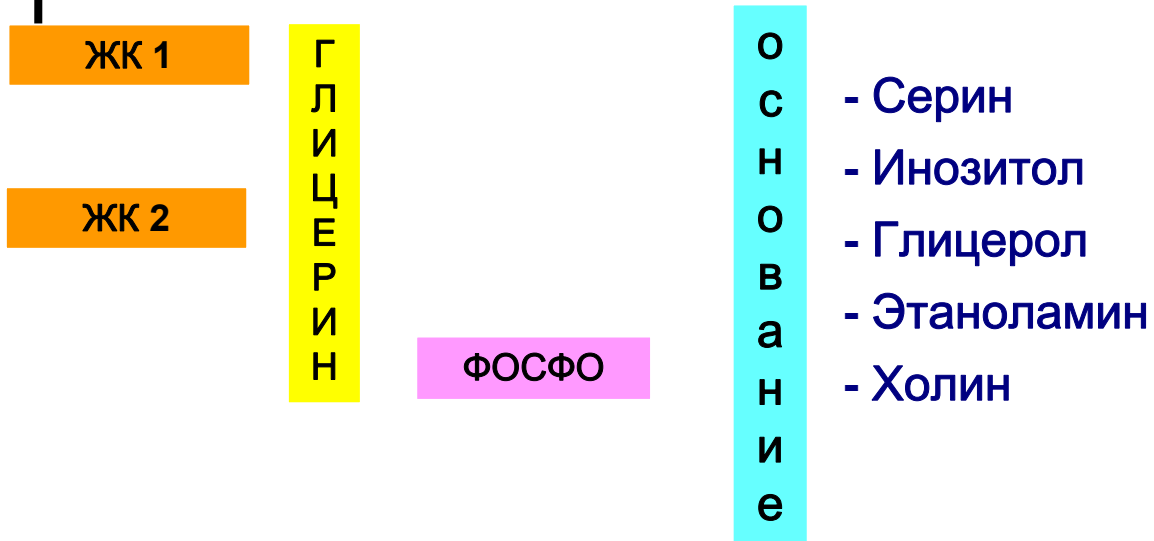
Greaves M, Cohen H, MacHin SJ, Mackie I. Guidelines on the investigation and management of the antiphospholipid syndrome. Br J Haematol. 2000;109:704-715.



Другие механизмы патогенности АФЛА

- В культурах АКЛА стимулируют выработку внутреннего фактора макрофагами
- АКЛА реагируют с тромбоцитами с их активацией, являются причиной тромбоцитопений у большинства больных АФС
- АКЛА активируют эндотелиальные клетки с экспрессией факторов адгезии
- АКЛА увеличивают связывание бета2ГП и протеина С – прокоагулянтная активность
- АКЛА способный увеличивать АЧТВ *in vitro*

Структура молекулы фосфолипидов



Кислые фосфолипиды: Кардиолипин
(Дифосфатидилглицерол)

Фосфатидилсерин
Фосфатидилинозитол
Фосфатидилглицерол

Нейтральные ФЛ: Фосфатидилэтанолламин

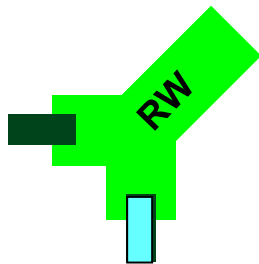
Фосфатидилхолин



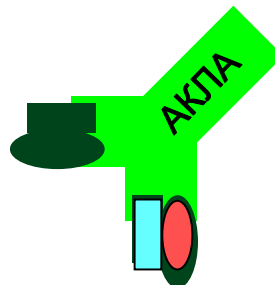
Почему кардиолипин?

- Кардиолипин (дифосфатидил-глицерол) имеет значительную структурную гомологию с другими фосфолипидами
- В большинстве случаев если отсутствуют антитела к кардиолипину (АКЛА) отсутствуют другие антифосфолипидные антитела (АФЛА)
- Исторически определения АКЛА более стандартизовано по сравнению с другими АФЛА
- Общепринятые единицы содержания АКЛА (Harris 1983): GPL - IgG; MPL - IgM

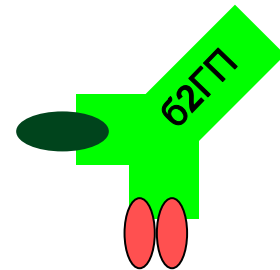
3 варианта аутоантител к фосфолипидам и кофакторам



Кардиолипин



КЛ+ β 2-ГП



β 2-ГП

1. Антитела в ложно-положительной RW (RPR -тест)
2. АКЛА (**бета2ГП-зависимые антитела**) реагируют с неоантигеном при связывании бета2ГП и ФЛ
3. **Антитела к бета2ГП** – антитела направлены к эпитопу, возникающему при димеризации белка на пластике ИФА планшета

Кофакторы АКЛА

β2-гликопротеин 1

Протромбин

Тромбомодулин

Протеин С

Протеин S

Фактор XI

Аннексин V

Кининоген

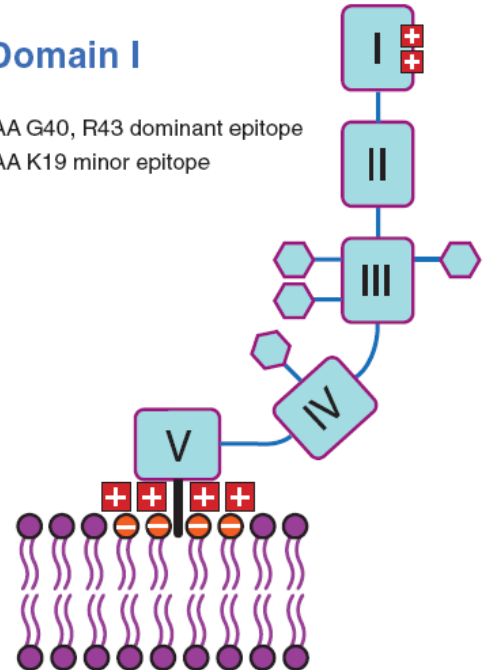
Тромбоциты

Эндотелиоциты

Связывание АКЛА и ко-фактора обусловлено конформационными перестройками белка в присутствии фосфолипидов

Domain I

- AA G40, R43 dominant epitope
- AA K19 minor epitope





Бета 2 гликопротеин

- Гликозилированная молекула, концентрация в плазме 150-300 мкг/мл
- Непрямая антикоагулянтная активность (ингибирование протромбинового комплекса, подавление активации тромбоцитов)
- Значение в фагоцитозе апоптотических клеток и окисленных липопротеинов
- Иммунизация лаб.животных - появление антифосфолипидных антител с увеличением % резорбций плода, тромбоцитопения и увеличение АЧТВ



Диагностические критерии
антифосфолипидного синдрома
Sydney Consensus Workshop

(Miyakis et al., J Thrombosis & Haemostasis, 2006)

Клинические критерии

- Сосудистый тромбоз
- Акушерско гинекологические проявления (замершая беременность и т.д.)

Серологические

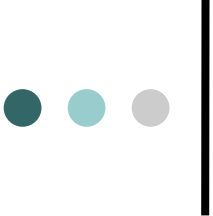
- Волчаночный антикоагулянт
- Антитела к кардиолипину (IgG/IgM)
- Антитела к бета2 гликопротеину 1(IgG/IgM)

1 критерий

+

1 критерий

⇒ АФС



Клинические проявления антифосфолипидного синдрома

Периферический тромбоз	Тромбоз глубоких вен Тромбоз артерий/вен	64%
Невынашивание	Ранний/поздний выкидыш Ранние роды	63%
Ревматические жалобы	Артралгия Артрит	68%
Неврологические явления	Мигрень Инсульт	66%
Кожные проявления	Livedo reticularis Язвы ног	40%
Гематология	Тромбоцитопения Гемолитическая анемия	30%
Сердечные проявления	Утолщение клапанов Инфаркт миокарда	27%
Легочные проявления	ТЭЛА Легочная гипертензия	20%

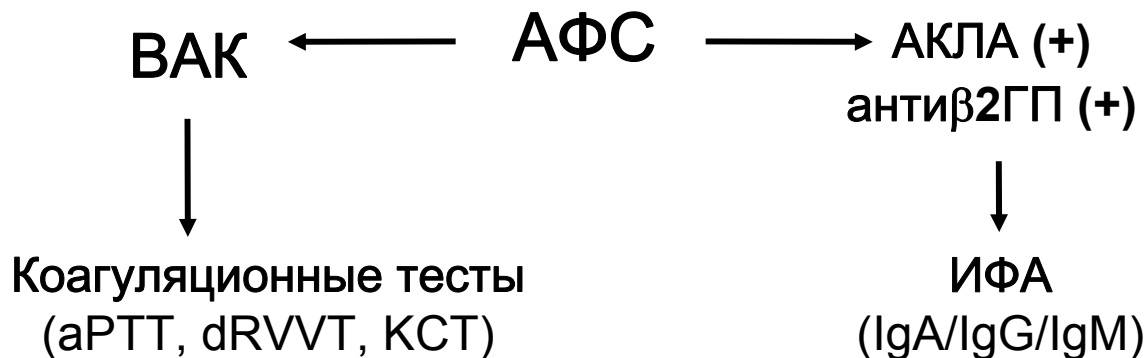


Классификация АФС

- **Первичный/идиопатический АФС** у лиц моложе 45 лет
- **Вторичный синдром** на фоне СКВ, СШ, склеродермии, опухолей, ВИЧ и ВГС, лекарств)
- **Катастрофический АФС** протекает как первая фаза ДВС с развитием полиорганной недостаточности
- **Серонегативный АФС** характеризуется отсутствием АКЛА при характерной клинике

Целесообразно измерение АКЛА/α-β2ГП через 3 недели-3 месяца после тромбоза

Как обследовать АФС?



Высокая специфичность
Низкая чувствительность
Влияние препаратов и состояния
системы коагуляции

Низкая специфичность
Высокая чувствительность
Количественное измерение
Техническая простота



Какие классы исследовать?

АКЛА у 1,000 больных АФС

(Cervera et al., Arthr. Rheum. 46: 1019, 2002)

Ig class	Prevalence in APS
IgM alone	12%
IgG alone	44%
IgG and IgM	32%
IgG and/or IgM	88%



Какие классы АКЛА выявлять?

Частота АКЛА у больных АФС

(Comparative study Dr. Madlener, Bad Nauheim, Germany)

АКЛА

Анти β 2-ГП

Класс Ig	Частота при АФС
только IgA	0%
только IgG	48%
только IgM	10%
IgG / IgM	86%
IgA / IgG / IgM	86%

Класс Ig	Частота при АФС
только IgA	19%
только IgG	10%
только IgM	19%
IgG / IgM	67%
IgA / IgG / IgM	86%

Какие параметры исследовать?

АКЛА против ВАК

АФС (n = 21)		АКЛА (IgG/IgM)	
		пол.	отр.
ВА	пол.	10	2
	отр.	7	2

⇒ АКЛА+ВАК =
91%

АКЛА и антиβ2ГП

АФС (n = 21)		АКЛА (IgG/IgM)	
		пол.	отр.
Анти-β2ГП1 (IgAGM)	пол.	15	3
	отр.	2	1

⇒ АКЛА +анти-β2ГП
95%



Лабораторная диагностика АФС

1. Коагулогические тесты: АЧТВ и волчаночный антикоагулянт
2. Антитела к кардиолипину IgGAM
3. Антитела к кардиолипину IgG/IgM
4. Антитела к бета 2-гликопротеину (IgGAM)
5. Антинуклеарный фактор и другие антинуклеарные антитела

Антитела к кардиолипину, β 2-гликопротеину и ВАК могут быть транзиторно повышены после вирусных инфекций – требуется повторное определение через 3-6 мес.

Общий алгоритм обследования больных заболеваниями соединительной ткани

