

Nowe testy serologiczne w diagnostyce reumatologicznej

New serologic test in the diagnostics of rheumatic conditions

Paweł Hrycaj

Zakład Reumatologii i Immunologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, kierownik Zakładu dr hab. med. Paweł Hrycaj
Oddział Reumatologii i Osteoporozy, Szpital Miejski im. J. Strusia w Poznaniu, ordynator Oddziału prof. dr hab. med. Stefan H. Mackiewicz

Słowa kluczowe: autoprzeciwiata, immunodiagnostyka, mikromacierze, czipy antygenowe.

Key words: autoantibodies, immunodiagnostics, microarrays, antigen chips.

Streszczenie

Od czasu odkrycia czynnika reumatoidalnego przez Waalera w latach 40. ubiegłego stulecia obserwuje się stały postęp w immunodiagnostyce chorób reumatycznych. Odkrycie przeciwciał przeciw cyklicznym cytrulinowanym peptydom (aCCP) pozwoliło poprawić diagnostykę wczesnych zapaleń stawów, chociaż wiele metod i procedur diagnostycznych nadal wymaga walidacji i standaryzacji. Wydaje się, że przyszłością diagnostyki serologicznej chorób reumatycznych stać się mogą metody oparte na proteomice, takie jak mikromacierze lub czipy antygenowe, które umożliwiają jednoczesną ocenę dużego panelu autoprzeciwciał, wysoki stopień standaryzacji i automatyzację oznaczeń z możliwością wykorzystania technik komputerowego wspomaganie diagnozy.

Summary

Since the discovery of rheumatoid factor by Waaler in the 1940s, there has been continuous progress in the immunodiagnostics of rheumatic diseases. Discovery of the anti-cyclic citrullinated peptide antibodies (aCCP) has led to significant improvement in diagnostics of early arthritis. Nevertheless, many methods and diagnostic procedures still require validation and standardization. It seems that proteomics-based methods like microarrays or antigen chips may become the future of immunodiagnostics of rheumatic conditions as they allow high level of multiplication, standardization and automation of analysis and are best suited for computer-assisted data interpretation.

Wstęp

Hipokrates uważał, że dolegliwości i choroby reumatyczne powstają w wyniku zaburzeń sptywu śluzu z mózgu do nosa. Chociaż ta koncepcja rozwoju reumatyzmu nie jest już aktualna, to jednak była pierwszą hipotezą, która zwróciła uwagę na rolę czynników humoralnych w patogenezie chorób reumatycznych. Początek współczesnej serologii i immunodiagnostyki chorób reumatycznych przypada na czasy znacznie późniejsze. Rozwój biochemii pozwolił na poznanie składu białkowego osocza [1]. Z czasem odkryto, że niektóre białka obecne we

frakcji globulinowej osocza (przeciwiata) pełnią funkcję ochronną dla ustroju i mają właściwość wiązania obcych cząsteczek – antygenów. W stanach chorobowych mogą pojawiać się jednak nieprawidłowe przeciwiata (auto-przeciwiata), które mają właściwość rozpoznawania własnych antygenów.

Pierwszym autoprzeciwciałem wykrytym u chorych na schorzenie reumatyczne (i równocześnie pierwszym autoprzeciwciałem wykrytym u człowieka) był czynnik reumatoidalny (*rheumatoid factor* – RF), opisany po raz pierwszy przez Waalera u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów (RZS). Chociaż u chorych na RZS opi-

Adres do korespondencji:

dr hab. med. Paweł Hrycaj, Zakład Reumatologii i Immunologii Klinicznej, Katedra Immunologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, ul. Przybyszewskiego 39, 60-356 Poznań, tel. +48 618 54 72 10, faks +48 618 54 72 13, e-mail: phrycaj@ump.edu.pl, www.reumatologia.ump.edu.pl

sano występowanie przeciwciał przeciwko wielu autoantygenom, jedynie 3 autoprzeciwciała – RF, przeciwciała przeciw cytrulinowanym białkom/peptydom (*anti-cyclic citrullinated peptide* – aCCP), przeciwciała przeciw białku wiążącemu immunoglobulinę (BiP) – mają wystarczającą czułość i swoistość, aby mogły być zastosowane dla potrzeb praktycznej immunodiagnostyki RZS, a jedynie dwa pierwsze takie zastosowanie znalazły [2].

Przeciwciała przeciw cyklicznym cytrulinowanym peptydom

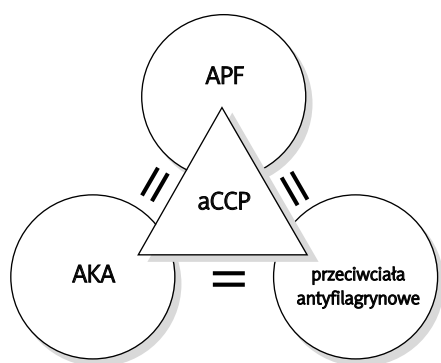
Chociaż aCCP weszły do rutynowej diagnostyki reumatologicznej zaledwie kilka lat temu, to historia ich odkrycia i pierwszych zastosowań ma już ponad 40 lat. W 1964 r. Nienhuis i Mandema opisali nowe autoprzeciwciała (nazwane przez nich czynnikiem przeciwokrążadrowym – *antiperinuclear factor* – APF), wykrywane u chorych na RZS za pomocą techniki immunofluorescencji pośredniej na podstawie charakterystycznego świecenia ziarnistości okołojądrowych komórek nabłonka błony śluzowej jamy ustnej [3]. Piętnaście lat później Young i wsp. opisali inne przeciwciała, które w metodzie pośredniej immunofluorescencji były wykrywane na podstawie świecenia zewnętrznych warstw nabłonka przetyku szczurzego [4]. Ponieważ początkowo sądzono, że antygenem dla tych przeciwciał jest keratyna, przeciwciała nazwano antykeratynowymi (*antikeratin antibodies* – AKA). Dalsze eksperymenty z wykorzystaniem technik adsorpcyjnych i enzymatycznych nie po-

twierdziły postulowanej swoistości przeciwciał – wykazano, że AKA reagują z kilkoma antygenami o masach cząsteczkowych 210 kD, 90–120 kD i 60–130 kD oraz ludzką filagryną nabłonkową (z czasem AKA zaczęto nazywać przeciwciałami antyfilagrynowymi). W 1995 r. Sebbag i wsp. wykazali, że APF i AKA/przeciwciała antyfilagrynowe są w istocie identyczne (ryc. 1.) [5]. Należy podkreślić, że AKA/przeciwciała antyfilagrynowe nie zrobiły wielkiej „kariery” jako rutynowy test w diagnostyce zapaleń stawów.

W dalszych badaniach wykazano, że za wiązanie APF/AKA/przeciwciał antyfilagrynowych odpowiada obecność reszt cytrulinowych w cząsteczkach antygeny. Obserwacja ta dała początek poszukiwaniom nowych testów diagnostycznych opartych na cytrulinowanych białkach lub peptydach, które cechowałyby większą czułość, niski koszt i niewielka pracochłonność, poprawiona powtarzalność wyników i łatwość wykonania w warunkach każdego laboratorium. Zastosowanie syntetycznych cyklicznych peptydów zawierających cytrulinę pozwoliło na optymalizację testów. Obecnie stosowane testy wykorzystują cykliczne peptydy drugiej i trzeciej generacji [6].

W metaanalizie przeprowadzonej przez francuskich badaczy wykazano, że aCCP cechuje wysoka swoistość i czułość dla RZS (odpowiednio >95 i 68%). Zaobserwowano także, że aCCP stosunkowo rzadko występują w przebiegu chorób reumatycznych innych niż RZS, takich jak „reumatyzm palindromiczny”, tłuszczycowe zapalenie stawów i toczeń rumieniowaty układowy [7].

Z kolei Rantapaa-Dahlqvist i wsp. oceniali dwie grupy szwedzkich krwiodawców, u których po latach rozwinęło się RZS. Obecność aCCP w surowicach chorych z okresu poprzedzającego rozwój choroby pozwalała na predykcję RZS z czułością sięgającą 52% i swoistością 98%. Dla porównania, czułość wyliczona w tej samej grupie dla oznaczeń RF wynosiła tylko 30% [8, 9]. Niedawno Berglin i wsp. wykazali, że obecność *shared epitopes* w *locus* HLA-DRB1 i aCCP w surowicy badanych krwiodawców pozwala na wyselekcjonowanie osób, u których w przyszłości rozwinie się RZS [10]. Johansson i wsp. wykazali związek między polimorfizmem genu PTPN22 w pozycji 1858, obecnością aCCP, czynnikiem reumatoidalnym i obecnością *shared epitopes* w *locus* DRB1 (HLA-DRB1 *0404 i *0401) a ryzykiem rozwoju RZS [11]. Wykrycie wariantu PTPN22 1858T i aCCP w surowicy chorych pozwalało na przewidywanie rozwoju RZS ze 100-procentową swoistością. Być może połączenie badań serologicznych i immunogenetycznych pozwoli w przyszłości na „przesunięcie” czasu rozpoznania RZS do bardzo wczesnej objawowej fazy choroby, a nawet rozpoznanie choroby przed wystąpieniem pierwszych uchwytłych objawów zapalenia stawów.



Ryc. 1. Związek między czynnikiem okołojądrowym, przeciwciałami antykeratynowymi, przeciwciałami antyfilagrynowymi a przeciwciałami anti-CCP.

Fig. 1. Relationship between antiperinuclear factors, antikeratin antibodies, antyfilaggrin antibodies, and anti-CCP antibodies.

Badania serologiczne w diagnostyce układowych chorób tkanki łącznej

Badania serologiczne, w szczególności wykrywanie przeciwciał przeciwjądrowych, stanowią podstawę immunodiagnostyki układowych chorób tkanki łącznej. Chociaż znane i stosowane od lat najważniejsze techniki badawcze (metoda immunofluorescencji pośredniej, metody immunoenzymatyczne, *western blot*) są ciągle doskonalone w celu poprawienia powtarzalności, czułości i swoistości oznaczeń, to nadal często zdarzają się znaczne różnice w wynikach oznaczeń wykonywanych w różnych ośrodkach diagnostycznych. Fakt ten wskazuje na pilną potrzebę standaryzacji i walidacji oznaczeń.

Podstawową zasadą immunodiagnostyki układowych chorób tkanki łącznej jest odpowiedni dobór testów diagnostycznych opierający się na następujących przesłankach:

1. Badane autoprzeciwciało jest charakterystyczne/patognomiczne dla danej jednostki chorobowej lub określonej grupy chorób.
2. Miano autoprzeciwciała odzwierciedla aktywność procesu chorobowego.
3. Obecność autoprzeciwciała koreluje z określonymi objawami klinicznymi i/lub profilem zmian narządowych w przebiegu choroby.
4. Obecność autoprzeciwciała ma znaczenie rokownicze w danej jednostce chorobowej.

We współczesnej immunodiagnostyce wykorzystuje się różne metody oznaczeń, z których najpowszechniej używane to metoda immunofluorescencji pośredniej, metody immunoenzymatyczne (ELISA), technika „colorzyme” (metoda immunoperoksydazowa, połączenie metody immunoenzymatycznej z techniką immunofluorescencji pośredniej), techniki *line blot*, *dot blot* i *western blot*.

Pełna immunodiagnostyka obejmuje zwykle 3–4 etapy [12]:

1. Ustalenie, czy w badanej surowicy znajdują się przeciwciała przeciwjądrowe za pomocą czułych testów przeglądowych (najczęściej wykorzystuje się w tym celu metodę immunofluorescencji pośredniej lub immunoenzymatyczną przy użyciu mieszaniny wysoko oczyszczonych antygenów jądrowych).
2. Ustalenie swoistości autoprzeciwciał w surowicach ANA+ (zwykle za pomocą metody immunoenzymatycznej, immunoperoksydazowej, *dot blot* lub *western blot*).
3. Sprawdzenie, czy w badanej surowicy znajdują się przeciwciała przeciw podtypom (*fine specificities*) poszczególnych autoantygenów (np. U_{1-sn} RNP – 68 kD, A i C, SSA – 60 kD, SSA – 52 kD), których występowanie koreluje z określonym zespołem objawów klinicz-

nych. Niekiedy na tym etapie potrzebne jest także rozszerzenie diagnostyki o wykrywanie przeciwciał przeciw niektórym antygenom cytoplazmatycznym, takim jak rybosomalne białko P, Jo-1 czy białka cytoszkieletu.

4. W kilku procentach przypadków konieczna może być dodatkowa immunodiagnostyka, z wykorzystaniem bardziej złożonych technik, o ile nie udało się ustalić swoistości przeciwciał w surowicach ANA+ za pomocą standardowych procedur diagnostycznych.

W surowicach ANA+ pewną pomocą w ustaleniu swoistości autoprzeciwciał może być ocena typu świecenia jąder komórkowych. Opisane wyżej wieloetapowe procedury są czasochłonne i pracochłonne oraz dość kosztowne, z tego względu poszukuje się dziś nowych metod diagnostycznych, które mogłyby przyspieszyć i zautomatyzować immunodiagnostykę chorób układowych tkanki łącznej. Rozwiązanie tego problemu może przynieść wykorzystanie metod i zasad proteomiki.

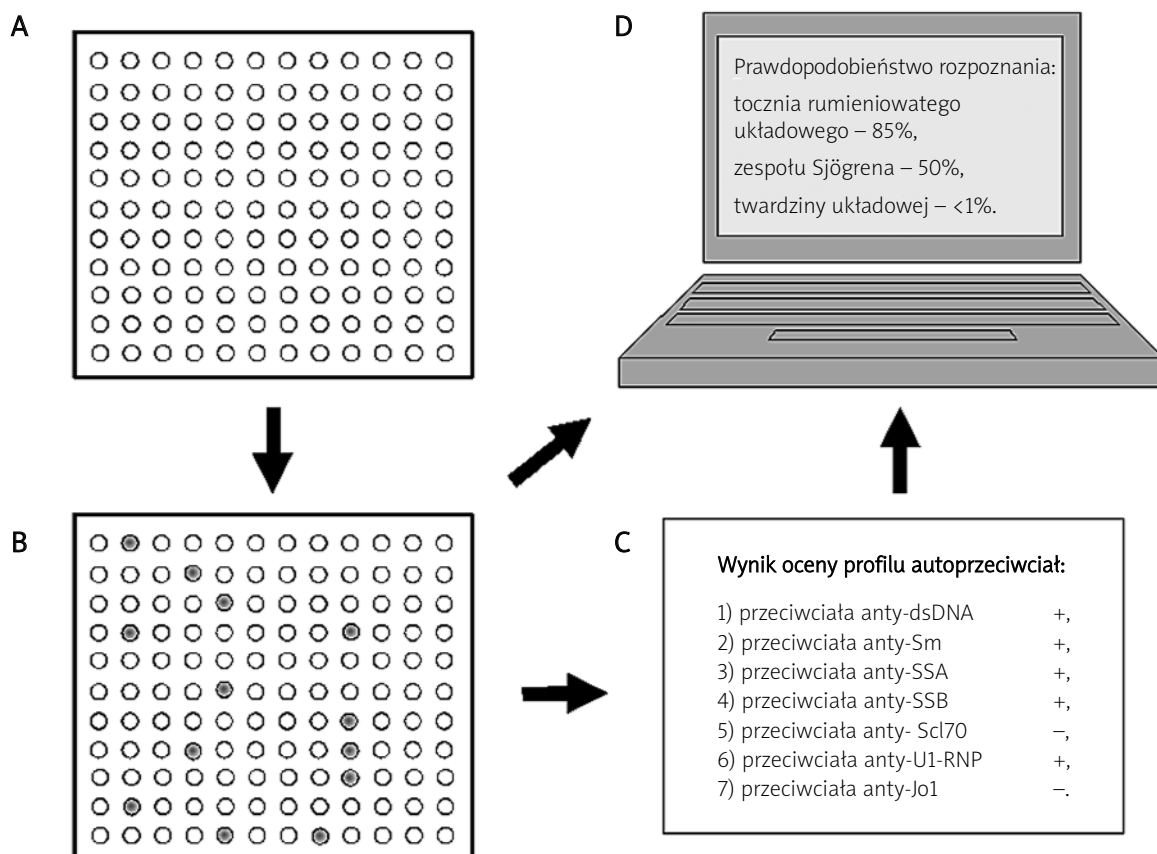
Proteomika – przyszłość immunodiagnostyki chorób reumatycznych?

Proteomika jest dziedziną nauki zajmującą się badaniem białek – ich struktury, sprawowanych przez nie funkcji i zależności między nimi. Termin ten jest zwykle używany do określenia badań białek prowadzonych na dużą skalę (analizy całych proteomów). Należy podkreślić, że proteomika jest dziedziną szerszą i bardziej złożoną niż genomika, ponieważ genom zmienia się w stosunkowo małym stopniu w porównaniu z białkami, których skład zmienia się nieustannie wskutek działania czynników wewnątrzpochodnych i środowiskowych. Liczba genów kodujących białka u człowieka jest znacznie mniejsza niż całkowita liczba białek w ludzkim proteomie (odpowiednio 22 tys. i ok. 400 tys.). Przypuszcza się, że przyczynami tej różnicy są procesy alternatywnego splicingu oraz modyfikacje potranslacyjne. Badanie genomu jest zatem niewystarczające, aby w pełni scharakteryzować różnorodność proteomu [13–18].

W uproszczeniu można powiedzieć, że zastosowanie technik proteomicznych w immunodiagnostyce układowych chorób tkanki łącznej sprowadza się do zastosowania technologii pozwalających na jednoczesne wykonanie oznaczeń autoprzeciwciał przeciwko wielu antygenom pochodzenia jądrowego i cytoplazmatycznego, co pozwala określić pełny profil zaburzeń immunologicznych stwierdzanych u danego chorego w pojedynczym oznaczeniu. Najważniejsze zalety takich metod to:

- możliwość pełnej automatyzacji oznaczeń i zmniejszenia ich pracochłonności,
- skrócenie czasu oczekiwania na wynik,

- poprawa powtarzalności i lepsza kontrola jakości oznaczeń,
 - poprawa czułości i swoistości oznaczeń pojedynczych autoprzeciwciał poprzez zastosowanie zestawu alternatywnych antygenów (np. zestawu kilkudziesięciu różnych cyklicznych cytrulinowanych peptydów i cytrulinowanych białek, pozwalającego wykryć różne swoistości przeciwciał antycytrulinowych, obecne w surowicach chorych),
 - możliwość jednoczesnego oznaczenia przeciwciał o znaczeniu diagnostycznym, różnicowym, predykcyjnym i prognostycznym, co pozwala na uzyskanie pełnej oceny statusu serologicznego u danego pacjenta,
 - możliwość automatycznej analizy za pomocą komputerowych systemów wspomagania diagnozy, co umożliwia uzyskanie danych co do prawdopodobieństwa rozpoznania danej choroby w badanym przypadku,
 - jednoczesna ocena czynników, które potencjalnie mogą interferować z wynikami oznaczeń (np. obecność RF),
 - łatwość kontrolowania zmian w profilu autoprzeciwciał związanych z rozwojem choroby lub zastosowanym leczeniem,
 - możliwość prowadzenia badań przesiewowych w populacjach z podwyższonym ryzykiem autoimmunizacji.
- Najczęściej stosowane techniki multipleksowe to:
- liniowe techniki *immunoblot* – pozwalają na jakościową lub półilościową ocenę od kilku do kilkunastu autoprzeciwciał w jednym oznaczeniu; technika wykorzystuje paski nośnika (zwykle nitrocelulozy), z naniesionymi w określonych miejscach wysoko oczyszczonymi antygenami w postaci cienkich linii; sposób przeprowadzenia inkubacji i interpretacji wyników jest zbliżony do powszechnie znanej techniki *western blot*;
 - cytometria przepływowa – pozwala na wykrywanie od kilkunastu do kilkudziesięciu autoprzeciwciał przy użyciu opłaszczonego nośnika, w postaci kulistych mikrocząstek (*microbeads*) różnej wielkości;
 - mikromacierze – technika pozwala na równoczesne oznaczenie nawet do kilkuset autoprzeciwciał



Ryc. 2. Wykorzystanie technologii czipów antygenowych w immunodiagnostyce chorób reumatycznych.
Fig. 2. Use of antigen chip technology in the immunodiagnosics of rheumatic conditions.

na podstawie naniesionych na fazę stałą antygenów tworzących rodzaj macierzy o określonym położeniu poszczególnych swoistości;

- czipy antygenowe (*antigen chip*) – technologia podobna do techniki mikromacierzy, która dzięki jeszcze większej miniaturyzacji pozwala na jednoczesne oznaczenie jeszcze większej ilości autoprzeciwciał; czip antygenowy powstaje w wyniku naniesienia za pomocą precyzyjnych robotów znikomych ilości antygenów na odpowiednio przygotowaną szklaną płytkę, dzięki czemu możliwe jest wykrywanie olbrzymiej liczby autoprzeciwciał w znikomej ilości materiału biologicznego (ryc. 2).

Wydaje się, że rosnąca wiedza na temat autoimmunizacji i konieczność oznaczania stale rosnącej liczby autoprzeciwciał w krótkim czasie u dużej liczby chorych będzie skutkować coraz powszechniejszym stosowaniem technik multipleksowych w rutynowej immunodiagnostyce układowych chorób tkanki łącznej.

Piśmiennictwo

1. Plebani M. Proteomics: the next revolution in laboratory medicine? *Clin Chim Acta* 2005; 357: 113-122.
2. Nell VP, Machold KP, Stamm TA, et al. Autoantibody profiling as early diagnostic and prognostic tool for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 1731-1736.
3. Nienhuis RL, Mandema E. A new serum factor in patients with rheumatoid arthritis; the antiperinuclear factor. *Ann Rheum Dis* 1964; 23: 302-305.
4. Young BJ, Mallya RK, Leslie RD, et al. Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Br Med J* 1979; 2: 97-99.
5. Sebbag M, Simon M, Vincent C, et al. The antiperinuclear factor and the so-called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 1995; 95: 2672-2679.
6. Mewar D, Wilson AG. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: a review. *Biomed Pharmacother* 2006; 60: 648-655.
7. Avouac J, Gossec L, Dougados M. Diagnostic and predictive value of anti-cyclic citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 845-851.
8. Rantapaa-Dahlqvist S, de Jong BA, Berglin E, et al. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 2741-2749.
9. Rantapaa-Dahlqvist S. Diagnostic and prognostic significance of autoantibodies in early rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2005; 34: 83-96.
10. Berglin E, Padyukov L, Sundin U, et al. A combination of autoantibodies to cyclic citrullinated peptide (CCP) and HLA-DRB1 locus antigens is strongly associated with future onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2004; 6: R303-R308.
11. Johansson M, Arlestig L, Hallmans G, et al. PTPN22 polymorphism and anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in combination strongly predicts future onset of rheumatoid arthritis and has a specificity of 100% for the disease. *Arthritis Res Ther* 2006; 8: R19.
12. Ząbek J. Podstawowe zasady racjonalnej serodiagnostyki autoprzeciwciał markerowych w układowych chorobach tkanki łącznej. *Reumatologia* 2005; 43: 335-340.
13. Binder SR, Hixson C, Glossinger J. Protein arrays and pattern recognition: new tools to assist in the identification and management of autoimmune disease. *Autoimmun Rev* 2006; 5: 234-241.
14. Binder SR. Autoantibody detection using multiplex technologies. *Lupus* 2006; 15: 412-421.
15. Hueber W, Kidd BA, Tomooka BH, et al. Antigen microarray profiling of autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 2645-2655.
16. Quintana FJ, Merbl Y, Sahar E, et al. Antigen-chip technology for accessing global information about the state of the body. *Lupus* 2006; 15: 428-430.
17. Robinson WH. Antigen arrays for antibody profiling. *Curr Opin Chem Biol* 2006; 10: 67-72.
18. Wu T, Mohan C. Proteomics on the diagnostic horizon: lessons from rheumatology. *Am J Med Sci* 2007; 333: 16-25.