

## Przeciwciała przeciw cytoplazmie granulocytów obojętnochłonnych u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów

*Antineutrophil cytoplasmic antibodies in 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:** przeciwciała przeciw cytoplazmie granulocytów obojętnochłonnych, choroby reumatyczne, reumatoidalne zapalenie stawów.

**Key words:** antineutrophil cytoplasmic antibodies, rheumatic diseases, rheumatoid arthritis.

### Streszczenie

Przeciwciała przeciw cytoplazmie granulocytów obojętnochłonnych (ANCA) są obecne w surowicy chorych w przebiegu zapalenia naczyń krwionośnych. Stwierdzane są głównie u chorych na ziarniniaka Wegenera oraz zespół Churga i Straussa. Występują także w innych chorobach tkanki łącznej, jednak ich częstość oraz znaczenie kliniczne w przebiegu chorób reumatycznych nie są do końca określone. Celem pracy była ocena częstości występowania i charakterystyka przeciwciał przeciw cytoplazmie granulocytów obojętnochłonnych w surowicy krwi chorych na reumatoidalne zapalenie stawów. Materiał do badań stanowiły surowice uzyskane od 377 chorych na reumatoidalne zapalenie stawów – 81 mężczyzn i 296 kobiet w wieku 26–67 lat (średnia wieku 47,6±3 lata). Grupę kontrolną stanowiło 183 chorych ze zmianami zwyrodnieniowymi – 65 mężczyzn i 118 kobiet w wieku 47–65 lat (średnia wieku 56,7±3,1 roku). Uzyskane do badań surowice poddano ocenie typu i miana ANCA metodą immunofluorescencji pośredniej, natomiast swoistość ANCA oceniano metodą ELISA. Obecność ANCA w surowicy krwi wykazano u 17,8% chorych na reumatoidalne zapalenie stawów. Okołojądrowy typ ANCA stwierdzono u 70,2% chorych, atypowy zaś w 29,8% przypadków. W 8,9% przypadków ANCA obecne w surowicy reagowały z mieloperoksydazą, w 40,3% przypadków reagowały swoiście z laktoferyną, natomiast w 8,89% przypadków wykazywały swoistość w stosunku do lizozymu. U 20,9% badanych przeciwciała te reagowały swoiście z katepsyną G, a u 20,9% ANCA wykazywały swoistość w stosunku do elastazy. W żadnym przypadku ANCA nie stwierdzono swoistości dla proteiny 3. Przeciwciała przeciw cytoplazmie granulocytów obojętno-

### Summary

ANCA occur in vasculitis, including Wegener's granulomatosis and Churg-Strauss syndrome. Their presence in some other 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 patients with rheumatoid arthritis.

Serum samples were obtained from 377 patients with rheumatoid arthritis without symptoms of vasculitis. The control group samples were 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 17.8% patients with rheumatoid arthritis. A perinuclear pattern of ANCA was observed in 70.2% and atypical ANCA in 29.8% of cases. We have not observed C-ANCA as well as the reactivity against proteinase 3. In 8.9% serum samples, ANCA yielded reactivity against myeloperoxidase, in 40.3% against lactoferrin and in 8.8% against lysozyme. In 20.9% cases the antibodies have indicated reactivity against cathepsin G and elastase. IgM-ANCA were detected in 7.5% and IgG-ANCA in 92.5% cases. In 58% it was IgG1 class and in 24.1% 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: 8.03.2006 r.

chłonnych w klasie IgM obserwowano u 5/67 chorych, co stanowiło 7,5% przypadków, w 92,5% ANCA występowały w klasie IgG. Stwierdzono je głównie w podklasie IgG1 u 36/62 chorych, co stanowiło 58%, i w podklasie IgG3 u 15/62 chorych, co stanowiło 24,1%.

## Wstęp

Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) należy do grupy układowych chorób tkanki łącznej, które charakteryzują się przewlekłym procesem zapalnym o podłożu autoimmunologicznym.

Zapalenie zostaje zapoczątkowane przez nieznaną przyczynę lub czynniki i ma charakter przewlekłe postępujący – dochodzi do zajęcia wielu narządów i układów. Proces zapalny w przebiegu RZS obejmuje głównie błonę maziową stawów, tkanki okołostawowe oraz narządy mięsiste, 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 autoanticypali 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, enzymy granulocytów obojętnochłonnych, lipidy – kardiolipina czy kwasy nukleinowe – DNA.

Przeciwciała te, poza rolą, jaką odgrywają w patogenezie niektórych jednostek chorobowych, mogą mieć znaczenie diagnostyczne. Czynniki reumatoidalne i przeciwciała przeciwjądrowe to najczęściej wykrywane auto-przeciwciała u chorych na RZS. 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 RZS, natomiast ANCA są skierowane przeciw składowym cytoplazmie granulocytów obojętnochłonnych.

Za pomocą 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 zapalenia naczyń, głównie ziarniniaka Wegenera, *microscopic polyangiitis* i gwałtownie postępującego, idiopatycznego kłębuszkowego zapalenia nerek [1]. Do chwili obecnej ostatecznie nie określono częstości występowania oraz roli ANCA w przebiegu RZS.

Celem pracy była ocena częstości występowania i charakterystyka przeciwciał przeciw cytoplazmie granulocytów obojętnochłonnych w surowicy krwi chorych na RZS.

## Materiał

Materiał do badań stanowiły surowice uzyskane od 377 chorych na RZS – 81 mężczyzn i 296 kobiet w wieku 26–67 lat (średnia wieku 47,6±3 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 RZS (metotreksat, sulfasalazynę, sole złota lub chlorochinę).

Chorych podzielono na II grupy. Pierwsza to 114 osób z wczesnym reumatoidalnym zapaleniem stawów, u których czas trwania choroby nie przekraczał 24 mies. (RZS <24 mies.) [69]. W tej grupie było 24 mężczyzn i 90 kobiet w wieku 26–64 lat (średnia wieku 40,6±3,5 roku). Do drugiej grupy zakwalifikowano 263 chorych na RZS, trwające dłużej niż 24 mies. (RZS >24 mies.). Było w niej 57 mężczyzn i 206 kobiet w wieku 37–67 lat (średnia wieku 51,5± 2,5 roku) (tab. I).

**Tabela I.** Charakterystyka badanej grupy  
**Table I.** Characteristics of the group of patients

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

Grupę kontrolną stanowiło 183 chorych ze zmianami zwyrodnieniowymi stawów: 65 mężczyzn i 118 kobiet w wieku 47–65 lat, średnia wieku  $56,7 \pm 3,1$  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.

## Metody

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

### 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 surowice, rozcieńczone w stosunku geometrycznym w PBS. Preparaty 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. Preparaty ponownie 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  $\times 100$ . 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 komercyjnie dostarczonych w odpowiednich stężeniach. Wykorzystano proteinazę 3 –  $0,7 \mu\text{g/ml}$ , mieloperoksydazę –  $0,5 \mu\text{g/ml}$ , elastazę –  $10 \text{ ng/ml}$ , laktoferynę –  $10 \mu\text{g/ml}$ , lizozym –  $1 \mu\text{g/ml}$  i katepsynę G –  $2 \mu\text{g/ml}$ . Mikro płytki (*Maxisorp immuno plates*, Nunc) optaszczano  $100 \mu\text{l}$  antygenem na studzienkę, rozpuszczonego w buforze optaszczającym i inkubowano przez noc w temperaturze pokojowej. Następnie 3-krotnie przepłukiwano buforem płuczającym i pozostawiano do wyschnięcia, po czym szczelnie zamykano i przechowywano w temp.  $4^\circ\text{C}$  do czasu badania. Badane surowice rozcieńczano w buforze do inkubacji i nakładano po  $100 \mu\text{l}$  na studzienkę. Ślepą próbę stanowił bufor do inkubacji.

Preparaty pozostawiano na 60 min w temperaturze pokojowej, ponownie przepłukiwano i nakładano po  $100 \mu\text{l}$  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 3-krotnie przepłukiwano i nakładano  $100 \mu\text{l}$  PNP (fosforan p.-nitrofenolowy). Ponownie inkubowano 60 min i odczytywano absorbancję przy długości fali  $405 \text{ nm}$  przy użyciu czytnika ELISA (Microplate Reader, ELX-800, USA).

### Ocena swoistości ANCA 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 oceny obecności i miana przeciwciał przeciwwądrowych (ANA) oraz przeciwciał przeciwwądrowych swoiście reagujących z jądrem granulocytów obojętnochłonnych (GS-ANA) dokonywano z wykorzystaniem metody immunofluorescencji pośredniej.

#### Obliczenia statystyczne

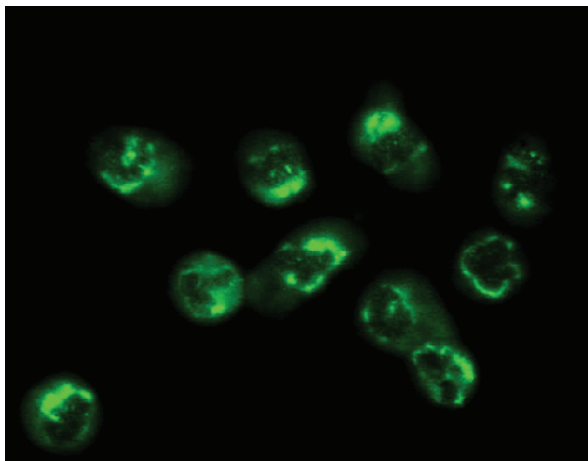
Analiza statystyczna uzyskanych wyników obejmowała obliczenia średniej arytmetycznej, odchylenia standardowego, błędu standardowego średniej arytmetycznej. Różnice między rozkładem dwóch grup oznaczano testem Manna-Whitneya. Współczynnik korelacji wyznaczono testem rank Spearmana. Za poziom ufności przyjęto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

## Wyniki

### Przeciwciała przeciw cytoplazmie granulocytów obojętnochłonnych w surowicy krwi

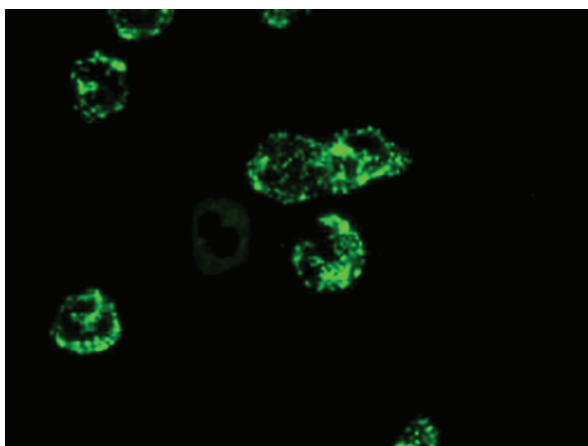
Obecność ANCA w surowicy krwi wykazano u 67/377 osób, co stanowiło 17,8% chorych na RZS. Obserwowano je w surowicy u 16/114 (14%) chorych we wczesnym okresie choroby, natomiast u osób z dłuższym czasem trwania objawów przeciwciała te wykazano u 51/263 badanych, co stanowiło 19,3%. Uzyskane wyniki nie wykazywały różnic statystycznie znamiennych ( $p > 0,05$ ). ANCA nie wykryto w żadnej z surowic pochodzących od osób z grupy kontrolnej.

Okołojądrowy typ ANCA stwierdzono u 47/67 (70,1%) chorych, a atypowy u 20/67 (29,8%) badanych. Uzyskane wyniki były statystycznie znamienne



**Ryc. 1.** Przeciwciała przeciw cytoplazmie granulocytów obojętnochłonnych – typ okołojądrowy (P-ANCA) (metoda immunofluorescencji pośredniej) powiększenie 1000 razy.

**Fig. 1.** Immunofluorescence staining pattern of P-ANCA.



**Ryc. 2.** Przeciwciała przeciw cytoplazmie granulocytów obojętnochłonnych – atypowa fluorescencja (A-ANCA) (metoda immunofluorescencji pośredniej) powiększenie 1000 razy.

**Fig. 1.** Immunofluorescence staining pattern of P-ANCA.

( $p < 0,001$ ). U chorych z wczesnym okresem RZS P-ANCA (ryc. 1.) stwierdzono w 8/16 surowic (50%). Z taką samą częstością wykrywano A-ANCA (ryc. 2.).

U chorych z wieloletnim czasem trwania choroby P-ANCA obserwowano u 39/51 (76,5%), A-ANCA zaś u 12/51 badanych, co stanowiło 23,5% przypadków. W żadnej z surowic zawierających ANCA nie stwierdzono świecenia cytoplazmatycznego.

Miano ANCA 1/80 wykazano w 40/67 (59,7%) przypadków, miano 1/160 w 22/67 (32,8%), a 1/320 w 5/67,

co stanowiło 7,5% surowic. ANCA w mianie 1/80 stwierdzano częściej, u 15/16 (93,7%) badanych we wczesnym okresie choroby (tab. II).

### Swoistość antygenowa, klasy i podklasy ANCA

W 6/67 (8,9%) przypadków ANCA obecne w surowicy reagowały z mieloperoksydazą, a w 27/67 reagowały swoiście z laktoferyną, co stanowiło 40,3% surowic ANCA+. W tym przypadku były to głównie (53,8%) surowice pochodzące od osób z długotrwałą chorobą, natomiast w 6/67 przypadków ANCA wykazywały swoistość w stosunku do lizozymu, co stanowiło 8,89% surowic ANCA+. U 14/67 (20,9%) badanych przeciwciała te reagowały swoiście z katepsyną G. W 14/67 (20,9%) przypadków ANCA wykazywały swoistość w stosunku do elastazy. W żadnym przypadku ANCA nie stwierdzono swoistości dla proteiny 3 (tab. III). Wykazano statystycznie znamienne ( $p < 0,05$ ) częstsze występowanie ANCA reagujących swoiście z laktoferyną w porównaniu z innymi antygenami.

Przeciwciała przeciw cytoplazmie granulocytów obojętnochłonnych w klasie IgM obserwowano w 5/67 przypadków, co stanowiło 7,5%. Występowały one jedynie w surowicy krwi chorych z wczesnym RZS. W 92,5% ANCA występowały w klasie IgG. Stwierdzono je głównie w podklasie IgG1 u 36/62 chorych, co stanowiło 58%, i w podklasie IgG3 u 15/62 chorych, co stanowiło 24,1%. We wczesnym okresie choroby nie obserwowano ANCA IgG występujących w podklasie IgG2 i IgG4 (tab. IV). Ponadto w tej grupie chorych ANCA swoiście reagujące z lizozymem występowały tylko w klasie IgM. Nie stwierdzono ANCA w klasie IgM w surowicach chorych z wieloletnim przebiegiem RZS (tab. V).

### Obecność innych autoprzeciwciał

Czynnik reumatoidalny w klasie IgM stwierdzono w 312/377 (82,7%) badanych surowic. Był on obecny w 54/114 (47,3%) surowic uzyskanych od chorych z wczesnym RZS i w 258/263 (98,1%) surowic uzyskanych od osób o długotrwałym przebiegu choroby. W surowicach, w których wykazano obecność ANCA, RF stwierdzono w 67/67 przypadków (100%). Okołojądrowy typ świecenia (P-ANCA) obserwowano u 47/67 osób, co stanowiło 70,2% surowic z obecnym czynnikiem reumatoidalnym. A-ANCA wykazano zaś w 17/100 (17%) surowic RF+. Pochodziły one głównie od chorych o długotrwałym przebiegu choroby. W żadnej surowicy A-ANCA+, pochodzącej od chorych we wczesnym okresie RZS, nie wykazano RF. Było to statystycznie znamienne ( $p < 0,001$ ). Obecności czynnika reumatoidalnego w surowicy krwi nie wykazano u żadnego chorego z grupy kontrolnej.

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

Czas trwania choroby	Typ ANCA	MIANO			
		1/40	1/80	1/160	1/320
RZS <24 mies.	P-ANCA (n=8)	0	8 (100%)*	0	0
	A-ANCA (n=8)	0	7 (87,5%)*	1 (12,5%)	0
RZS >24 mies.	P-ANCA (n=39)	0	19	16	4
	A-ANCA (n=12)	0	6	5	1

\*p<0,001

**Tabela III.** Swoistość antygenowa ANCA 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	Typ ANCA	Antygen					
		PR-3	MPO	LF	LZ	KG	EL
RZS <24 mies.	P-ANCA (n=8)	0	2	6	0	0	0
	A-ANCA (n=8)	0	0	0	1	5	2
RZS >24 mies.	P-ANCA (n=39)	0	4	21 (53,8%)*	0	2	12
	A-ANCA (n=12)	0	0	0	5	7	0

\*p<0,001

**Tabela IV.** Charakterystyka klasy i podklasy immunoglobulin ANCA obecnych w surowicy krwi w zależności od ich typu

**Table IV.** Characteristics of ANCA immunoglobulin class and subclass according to immunofluorescence pattern

Czas trwania choroby	Typ ANCA	Klasa /podklasa Ig				
		IgM	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
RZS <24 mies.	P-ANCA (n=8)	3	4	0	1	0
	A-ANCA (n=8)	2	5	0	1	0
RZS >24 mies.	P-ANCA (n=39)	0	21	3	12	3
	A-ANCA (n=12)	0	6	2	2	2

Ig – immunoglobulina

Określano również miano czynnika reumatoidalnego. Za dodatni wynik, w odczynie wiązania lateksu, uważano miano powyżej 1/40. Najczęściej stwierdzanym mianem czynnika reumatoidalnego było miano 1/160, które wykazano w 22/67 (32,8%) przypadków. Nie wykazano zależności pomiędzy mianem czynnika reumatoidalnego a mianem i typem ANCA. W tab. VI zamieszczono wartości miana dla poszczególnych grup w zależności od czasu trwania choroby i typu ANCA.

Przeciwciała przeciwjądrowe stwierdzono w 42/377 surowic, co stanowiło 11,2% surowic uzyskanych od chorych na RZS. Obserwowano je u 13/114 (11,4%) chorych we wczesnym okresie choroby i u 29/263 (11%) chorych z wieloletnim przebiegiem. Wykazywały one

plamisty typ świecenia. W 1/16 (6,25%) przypadków stwierdzono jednoczesną obecność w surowicy ANCA i ANA, których miano wynosiło 1/80. Była to osoba chorego na wczesne RZS. W ANCA+ surowicach pochodzących od osób z wieloletnim czasem trwania choroby ANA były obecne w 2/51 (3,9%) przypadków, a ich miano wynosiło 1/80 i 1/160. Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy między mianem i typem ANCA a mianem ANA ( $p > 0,05$ ). U żadnego chorego z grupy kontrolnej nie wykazano obecności ANA w surowicy.

W 14/377 (3,7%) badanych surowic wykazano obecność GS-ANA. Surowice te pochodziły od chorych z wieloletnim przebiegiem RZS. U żadnej z tych osób nie stwierdzono jednoczesnej obecności ANCA. GS-ANA nie

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

Czas trwania choroby	Klasa/podklasa IG	Antygen					
		PR-O	MPO	LF	LZ	KG	EL
RZS <24 mies.	IgM	–	1/2	2/6	1/1	1/5	0
	IgG1	–	1/2	3/6	0	3/5	2/2
	IgG2	–	0	0	0	0	0
	IgG3	–	0	1/6	0	1/5	0
	IgG4	–	0	0	0	0	0
RZS >24 mies.	IgM	–	0	0	0	0	0
	IgG1	–	3/4	12/21	2/5	4/9	6/12
	IgG2	–	0	3/21	1/5	1/9	0
	IgG3	–	1/4	5/21	1/5	3/9	4/12
	IgG4	–	0	1/21	1/5	1/9	2/12

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

**Tabela VI.** Wartości miana RF w surowicy ANCA+  
**Table VI.** Titers of the 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 mies.	P-ANCA (n=8)	2	5	1	0	0
	A-ANCA (n=8)	4	3	1	0	0
RZS >24 mies.	P-ANCA (n=39)	11	10	8	7	3
	A-ANCA (n=12)	3	4	3	1	1

Ig – immunoglobulina

obserwowano w surowicach pochodzących od osób z grupy kontrolnej.

## Dyskusja

Występowanie ANCA u chorych na RZS oceniano nie wielu badaczy [7–9]. Badano je głównie w surowicy krwi. Za pomocą metody immunofluorescencji pośredniej wykrywano szczególnie 2 typy przeciwciał: P-ANCA i A-ANCA. Ten ostatni rodzaj charakteryzuje się atypowym obrazem świecenia i najczęściej jest obserwowany właśnie u chorych na RZS. Częstość występowania ANCA u chorych na RZS wahała się od 16 do 72%. Braun i wsp. [9], badając 385 chorych na RZS, wykazali obecność ANCA w surowicy 16% badanych. Były to głównie ANCA o okołojądrowym typie świecenia. U chorych, u których wykrywano te przeciwciała, obserwowano objawy narządowe choroby w postaci zapalenia naczyń i powikłań płucnych. Podobnych obserwacji dokonali Vittecoq i wsp. [10]. Analizując 102 przypadki, wykazali oni, że ANCA są obecne u 18,5% chorych na RZS. Były to głównie P-ANCA, a ich obecność stwierdzano u chorych z wieloletnim przebiegiem choroby bez jakichkolwiek objawów narządowych. Mustila i wsp. [11], badając 246 chorych, wykazali obecność ANCA w 22% surowic uzyskanych od chorych na RZS. Podobnie jak w innych badaniach, najczęściej były to P-ANCA. U tych chorych występowały objawy zajęcia nerek w przebiegu choroby trwającej dłużej niż 10 lat. Mulder i wsp. [12] stwierdzili natomiast obecność ANCA u 72% osób, szczególnie u tych z długoletnim przebiegiem choroby. Helsloot i wsp. [13] wykazali ANCA u 23,5% chorych, natomiast Afeltra i wsp. [14] u 35% chorych na RZS. W badaniach przeprowadzonych w grupie 377 chorych obecność ANCA w surowicy krwi wykazano u 17,8% chorych na RZS. Obserwowano je u 14% pacjentów we wczesnym okresie choroby i u 19,3% osób z jej wieloletnim przebiegiem. Duża różnica pomiędzy częstością występowania ANCA, obserwowana przez poszczególnych autorów, jest prawdopodobnie związana z doborem grupy badanej. Okazuje się, że jeżeli obserwacji poddani zostali chorzy, u których czas trwania choroby wynosił do 2 lat, częstość występowania ANCA wynosiła ok. 18–20% [10, 15]. Jeśli natomiast objawy choroby trwały dłużej niż 2 lata, to częstość występowania ANCA w surowicy krwi była wyższa. Bosch i wsp. [8], badając chorych, u których średni czas trwania choroby wynosił 11,2 roku, wykazali ANCA u 49% osób. Duża różnica wyników częstości ANCA w surowicy pomiędzy poszczególnymi autorami może wynikać również z doświadczenia osoby oceniającej ANCA. Wiadomo, że obecne w surowicy ANA powodują świecenie jąder komórkowych podobne do wywoływanego przez P-ANCA. Ten czynnik może więc także wpłynąć na pozorne zwiększenie częstości ANCA w surowicach chorych na RZS.

W przedstawianej pracy, podobnie jak w pracach innych autorów, najczęściej, czyli w 70,1% badanych surowic, obserwowanym typem przeciwciał były P-ANCA. Mustila i wsp. [16] stwierdzili obecność P-ANCA u 96% chorych. Obserwowano je głównie u chorych z długoletnim przebiegiem choroby. W przeciwieństwie do Vittecoq i wsp. [10] obserwowano jednak także A-ANCA, co jest zgodne ze spostrzeżeniami Afelta i wsp. [14] oraz de Bandt i wsp. [15]. Mustila i wsp. [16] A-ANCA obserwowali u 4% chorych, charakteryzując je jako atypowe C-ANCA. W obecnej pracy nie wykazano różnic pomiędzy częstością A-ANCA i P-ANCA we wczesnym RZS, a u chorych z wieloletnim RZS A-ANCA wykrywano rzadziej. Obecności A-ANCA nie obserwowali w swoich pracach Coremans i wsp. [18], a także inni autorzy [13, 14]. Te różnice w ocenie typu ANCA w metodzie immunofluorescencji pośredniej mogą wynikać ze sposobu przygotowania antygeny, a także z doświadczenia osoby oceniającej. W przedstawianych badaniach w żadnym przypadku nie obserwowano cytoplazmatycznego typu świecenia przeciwciał (C-ANCA). Uważa się, że występują one w RZS niezmiernie rzadko. Jeżeli jest potwierdzona swoistość ANCA dla proteinazy 3, wówczas okazuje się, że objawy RZS współistnieją z rozległymi zmianami o typie *vasculitis*. C-ANCA, oceniane metodą immunofluorescencji o niepotwierdzonej swoistości, mogły jednak w rzeczywistości należeć do ANCA o atypowym świeceniu.

W omawianej pracy wykazano, że miano ANCA w surowicy u chorych na RZS jest przeważnie niskie, w 59,7% surowic wynosiło 1/80, a w 32,8% surowic 1/160. Wyniki te także potwierdzają obserwacje innych autorów [15].

Do tej pory nie ustalono głównego antygeny, z którym swoiście reagują ANCA pojawiające się w surowicy w przebiegu RZS. W dotychczasowych doniesieniach postuluje się, że przeciwciała te reagują z mieloperoksydazą, laktoferyną, elastazą oraz lizozymem. Mulder i wsp. [12] stwierdzili, że P-ANCA reagowały swoiście z MPO, laktoferyną i katepsyną G. Braun i wsp. [9] wykazali, że obserwowane u 16% chorych P-ANCA reagowały najczęściej z lizozymem, rzadziej z MPO, laktoferyną, katepsyną G, elastazą. Wyniki te potwierdzili Mustila i wsp. [11], przy czym w ich badaniach częstość przeciwciał reagujących z lizozymem i z laktoferyną była podobna. Większą częstość ANCA skierowanych przeciwko laktoferynie obserwowali także Vittecoq i wsp. [10], natomiast Cambridge i wsp. [18] wykazali, że u 12% chorych na RZS P-ANCA w surowicy reagowały swoiście tylko z mieloperoksydazą. Uesugi i wsp. [19] stwierdzili obecność P-ANCA u 55% chorych na RZS, reagowały one swoiście wyłącznie z białkami HMG1 i HMG2. Autorzy sugerują, że to właśnie te białka mogą spełniać rolę antygeny, z którym reagują P-ANCA stwierdzane u chorych. Ponadto wykazali oni, że

P-ANCA pojawiały się w surowicy chorych z aktywną postacią choroby. Wydaje się, że P-ANCA reagujące z HMG1 i HMG2 należałoby określić raczej jako pseudo-ANCA. Są one raczej wynikiem udzielonego świecenia przez przeciwciała przeciwnądrowe, stwierdzane u części chorych w przebiegu RZS, szczególnie z dużą aktywnością choroby, niż ANCA *per se*.

Niektórzy autorzy donoszą jednak, że ANCA wykrywane metodą immunofluorescencji u chorych na RZS nie wykazują żadnej swoistości antygenowej z dotychczas badanymi antygenami. Uważa się ponadto, że ANCA mogą reagować z większą liczbą enzymów ziarnistości granulocytów obojętnochnonnych niż się tego spodziewamy.

W przypadku A-ANCA wykazano, że reagują one z MPO oraz laktoferyną [14], chociaż Helsloot i wsp. [13] nie potwierdzili reaktywności A-ANCA z mieloperoxydazą, obserwując jedynie swoistość dla laktoferyny.

W omawianych badaniach ANCA reagowały w 40,3% swoiście z laktoferyną. Stwierdzono je w 53,8% surowic chorych z wieloletnim przebiegiem choroby, natomiast w 8,9% przypadków reagowały one swoiście z mieloperoxydazą, w 8,8% z lizozymem, w 20,9% z katepsyną G i elastazą. Nie stwierdzono swoistości skierowanej dla proteinazy 3. Uzyskane wyniki potwierdzają wcześniejsze obserwacje innych autorów [20].

Określając typ ANCA wykrywanych w surowicy krwi i ich swoistość antygenową, oceniano także klasę i podklasę immunoglobulin, do których te przeciwciała należały. W przedstawianej pracy wykazano, że ANCA należały w 92,5% do klasy IgG. Stwierdzono je głównie w podklasie IgG1 u 58% i IgG3 u 24,1% chorych. ANCA IgM stwierdzono zaś w 7,5% badanych surowic. Interesujące jest stwierdzenie nieobecności ANCA w klasie IgM u chorych z wieloletnim przebiegiem choroby. Tłumaczyć to można faktem, że IgM jest immunoglobuliną filogenetycznie pojawiającą się najwcześniej w procesie syntezy przeciwciał pod wpływem stymulacji antygenowej. IgM-ANCA może być zatem wyindukowane przez nieznaną czynnik we wczesnej fazie choroby, w miarę jej trwania zostało zastąpione przez przeciwciała klasy IgG. Cambridge i wsp. [18] wykazali u chorych na RZS obecność MPO-ANCA występujących w klasie IgG, szczególnie w IgG1 i IgG3. Autorzy ci zaobserwowali przewagę podklasy IgG4 u chorych ze zmianami o charakterze *vasculitis*. Wyniki uzyskane w przedstawianej pracy potwierdzają obserwacje autorów angielskich. Brak przewagi ANCA w podklasie IgG4 w obecnych badaniach należy tłumaczyć specyfiką dobranej grupy – chorzy bez objawów klinicznych zapalenia naczyń.

Wiadomo, że poszczególne podklasy immunoglobulin wykazują bardzo istotne różnice w działaniu biologicznym. Dotyczy to zwłaszcza ich właściwości do łączenia się i aktywacji składowych dopełniacza oraz powinowactwa do Fc receptorów. Wykazano, że podklasy

autoprzeciwciał w przebiegu chorób reumatycznych są istotnym czynnikiem biorącym udział w ich patogenezie. Na przykład przeciwciała przeciw DNA, zaliczane do podklasy IgG1 i IgG3, występowały u chorych na toczeń układowy ze zmianami w obrębie kłębuszków nerkowych, natomiast przeciwciała klasy IgG1 i IgG2 kojarzyły się ze zmianami skórnymi. Z doniesień innych autorów oraz z własnych obserwacji wynika raczej, że podklasa ANCA immunoglobulin nie odgrywa istotnej roli w przebiegu RZS [21].

W przedstawianej pracy wykazano zależność pomiędzy obecnością ANCA w surowicy i czynnika reumatoidalnego w chorych na RZS. P-ANCA obserwowano w 70,2% surowic, w których wykryto także czynnik reumatoidalny (serologicznie dodatnia postać RZS), A-ANCA zaś w 17% surowic RF+. Współzależność ta spostrzegana była szczególnie u osób z wieloletnim czasem trwania choroby. Podobne wyniki uzyskał Metzger i wsp. [22], którzy wykazali istotnie statystycznie częściej czynnik reumatoidalny w przypadku surowic zawierających P-ANCA. Nie wykazano jednak żadnej zależności pomiędzy ANCA a mianem RF. Z jednej strony można to tłumaczyć koincydencją dwóch niezależnych autoprzeciwciał w przebiegu RZS, które – jak wiadomo – charakteryzuje poliklonalna aktywacja limfocytów B. Z drugiej zaś strony czynnik reumatoidalny jest zwykle obecny w przebiegu RZS, natomiast ANCA pojawiają się dodatkowo. Współwystępowanie MPO-ANCA i czynnika reumatoidalnego wiązało się z dużą aktywnością choroby oraz aktywnością zapalenia błony maziowej, co sugeruje, że równoczesna obecność MPO-ANCA i czynnika reumatoidalnego u chorych na RZS może być wykładnikiem złego rokowania. Wymaga to jednak przeprowadzenia szczegółowych obserwacji klinicznych z uwzględnieniem większej grupy chorych, zwłaszcza z objawami pozastawowymi choroby i cechami zapalenia naczyń.

#### 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 Engl 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 D, et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum* 1986; 29: 1039-49.
4. Wiik A. Delineation of a standard procedure for indirect immunofluorescence detection of ANCA. *APMIS Suppl* 1989; 6: 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. 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. 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.
11. Mustila A, Paimela L, Leirisalo-Repo M. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with early rheumatoid arthritis: an early marker of progressive disease. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1371-7.
12. Mulder AH, Horst G, van Leeuwen MA, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 1054-60.
13. Helsloot J, Virgo S, McGuigan L, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory arthritis - potential for misdiagnosis? *Br J Rheumatol* 1995; 34: 820-4.
14. 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.
15. De Bandt M, Meyer O, Haim T, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in rheumatoid arthritis patients. *Br J Rheumatol* 1996; 35: 38-43.
16. Mustila A, Korpela M, Mustonen J, et al. Perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibody in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 710-7.
17. Coremans IEM, Hagen EC, van der Woude F, et al. Antilactoferrin antibodies in patients with rheumatoid arthritis are associated with vasculitis. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 1466-75.
18. 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.
19. Uesugi H, Ozaki S, Sobajima J, et al. Prevalence and characterization of novel p-ANCA antibodies to the high mobility group non-histone chromosomal proteins HMG1 and HMG2, in systemic rheumatoid diseases. *J Rheumatol* 1998; 25: 703-9.
20. Kirdaite G, Dadoniene J, Bagdonaite L, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in patients with rheumatoid arthritis: clinical and laboratory correlations. *Centr Eur J Immunol* 2001; 26: 169-73.
21. Jayne DR, Weetman AP, Lockwood CM. IgG subclass distribution of autoantibodies to neutrophil cytoplasmic antigens in systemic vasculitis. *Clin Exp Rheumatol* 1991; 84: 476-81.
22. Metzger D, Rother E, Melchers I, et al. Anti-neutrophilen-zytoplasm-antikörper (ANCA) bei rheumatoider arthritis: spezifität und klinische relevanz? *Immun Infekt* 1993; 21: 18-20.