

# АНТИНУКЛЕАРНЫЕ АНТИТЕЛА: ЛАБОРАТОРНЫЕ ТЕСТЫ И ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Лапин С.В., Тотолян А.А.

Санкт-Петербургский Государственный Медицинский Университет им. акад. И.П.Павлова, лаборатория клинической иммунологии

**Резюме.** Статья посвящена лабораторному выявлению и клиническому значению антинуклеарных антител (АНА). Методы описаны с рядом практических подробностей, способных дать представление о современных возможностях лабораторных тестов для выявления АНА. В статье отражены основные клинико-лабораторные корреляции и диагностические схемы.

**Ключевые слова:** Антинуклеарные антитела, антинуклеарный фактор, аутоиммунные заболевания, диагностика.

Lapin S.V., Totolian A.A.

## ANTINUCLEAR ANTIBODIES: LABORATORY TESTS AND DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE

**Abstract.** The article concerns the main aspects of detection and clinical significance of antinuclear antibodies (ANA). Up-to-date laboratory testing methods are discussed in detail. The paper reviews the basic concepts of correspondence between clinical and laboratorial parameters as well as some diagnostic schemes. (*Med.Immunol.*, 2001, vol.3, N1, pp 35-50)

Одним из основных достижений клинической иммунологии, обогативших лабораторное обследование ревматологических больных и ставших незаменимым инструментом для ранней диагностики и идентификации основных ревматических заболеваний, без сомнения стало открытие антинуклеарных антител (АНА). Тесты по выявлению АНА входят в число самых распространенных серологических тестов в клиниках всего мира и без сомнения являются наиболее часто используемым клиническим анализом в практических иммунологических лабораториях. Их выявление широко используется в ревматологии и гепатологии, акушерстве и гинекологии, нефрологии и эндокринологии, в дерматологии и неврологии, где клиницисту приходится иметь дело с аутоиммунными заболеваниями. Это обуславливает интерес к проблеме их лабораторного обнаружения и клинического применения [2,3,4].

АНА представляют собой семейство аутоантител, взаимодействующих с рибонуклеиновыми кислотами и белками ядра и встречающихся более чем у 90% больных с системными заболеваниями соединительной тка-

ни, такими, как системная красная волчанка (СКВ), системный склероз (СС), синдром Шогрена (СШ), смешанное заболевание соединительной ткани (СЗСТ), полимиозит/дерматомиозит (ПМ/ДМ) (табл. 1). Кроме того, АНА могут быть обнаружены при множестве

Табл. 1. ЗАБОЛЕВАНИЯ И СОСТОЯНИЯ, СОПРОВОЖДАЕМЫЕ ВЫЯВЛЕНИЕМ АНА

Заболевания	Встречаемость АНА
Системная красная волчанка	95%
Системный склероз	95%
Синдром Шогрена	95%
Дерматомиозит, полимиозит	30-50%
Смешанные заболевания соединительной ткани	100%
Дискоидная красная волчанка	50-60%
Локализованная склеродермия	50%
Ревматоидный артрит	30-40%
Юношеский ревматоидный артрит	50-60%
Аутоиммунный гепатит	95-100%
Первичный билиарный цирроз	95-100%
Узелковый полиартериит	10-20%
Злокачественные заболевания	10-20%
Хроническое невынашивание беременности	10-15%
Пожилые	10%
Здоровые женщины	5%

### Адрес для переписки:

197089, Санкт Петербург, ул. Льва Толстого, 6/8  
Лаборатория клинической иммунологии,  
Лапину Сергей Владимирович  
Тел.: (812) 238-71-94.  
E-mail: svlapin@mail.ru.

Табл. 2. СПИСОК ОСНОВНЫХ ТИПОВ АНА

Специфичность	Связь с ревматическими заболеваниями
<b>Ядерные антигены</b>	
<i>Хроматин ассоциированные</i> ДсДНК ДсДНА и осДНК ДсDNA Ku PCNA/Ga/LE-4 Ламины А,В,С	СКВ  СКВ, ДКВ, РА СКВ, СЗСТ СКВ Люпоидный гепатит
<i>Гистоны</i> H1, H2A, H2B, H3, H4 Только H3	Лекарственная СКВ СКВ, ДКВ, РА, ПБЦ, СС
<i>Компоненты сплайсосомы</i> Sm U1 snRNP U2 snRNP  U4/U6 snRNP U5 snRNP U7 snRNP U11snRNP	СКВ СКВ, СЗСТ, вСКВ СКВ, СЗСТ, перекрестные синдромы СШ, СС СКВ, СЗСТ СКВ СС
<i>Рибонуклеопротеины</i> Ro/SS-A СС La/SS-B Mi-2 p80-койлин MA-1	СШ, вСКВ, СКВ, ПБЦ, СС  СШ, ПККВ, вСКВ, СКВ ДМ/ПМ СШ
<i>Нуклеоллярные</i> РНК – полимеразы РНКп-1 РНКп-2 РНКп-3 рибосомальный RNP топоизомераза 1 (Scl-70) U3 snoRNP (фибрилларин) Th snoRNP (Rnase MRP) NOR90 (hUBF) Pm-Scl (PM-1)	СС СС, СКВ СС СКВ СС  ДМ/ПМ, СС
<b>Цитоплазматические антигены</b>	
тРНК синтазаы тРНК <sup>His</sup> (Jo-1) тРНК <sup>Thr</sup> (PL-7) тРНК <sup>Ala</sup> (PL-12) тРНК <sup>Gly</sup> (EJ) тРНК <sup>Leu</sup> (OJ) SRP (сигнал распознающая частица) KJ Фактор элонгации 1 $\alpha$ (Fer) тРНК <sup>Ser</sup> (Mas)	ПМ/ДМ      ПМ Миозит

**Примечания:**

ДКВ – дискоидная красная волчанка, вСКВ – синдром врожденной волчанки, ПБЦ – первичный билиарный цирроз, ПККВ – подострая кожная красная волчанка, ПМ – полимиозит, ДМ – дерматомиозит, СС – системный склероз, СШ – синдром Шогрена, СЗСТ – смешанное заболевание соединительной ткани, РА – ревматоидный артрит.  
\*- не выявляются на криосрезках ткани и большинстве клеточных линий, оптимальный субстрат – Нер-2.

инфекционных, воспалительных и онкологических заболеваний. Хотя в ряде случаев антитела могут иметь патогенетическое значение, что показано по отношению к антителам к двуспиральной ДНК (дсДНК) при СКВ с поражением почек, большинство разновидностей АНА являются скорее вторичным феноменом по отношению к деструкции ткани.

К настоящему времени описано более 100 разновидностей АНА [28], направленных против нуклеиновых кислот, гистонов, белков ядерной мембраны, компонентов сплайсосомы, рибонуклеопротеинов, белков ядрышек и центромер (табл. 2). Антитела к цитоплазматическим антигенам, выявляющиеся при полимиозите и дерматомиозите взрослых, также причисляются к АНА, так как они направлены против рибопротеиновых структур, и в их возникновении, предположительно, участвуют сходные патогенетические механизмы.

## Лабораторные методы обнаружения АНА

### Непрямая иммунофлюоресценция и типы свечения

Непрямая иммунофлюоресценция является высокочувствительным скрининговым методом для выявления АНА. Сыворотка больного в серийных разведениях инкубируется с клетками или тканью-субстратом в лунках предметного стекла. Это позволяет присутствующим в сыворотке АНА связаться с клеточными мишенями внутри клеток. После отмывки белков сыворотки, не вступивших во взаимодействие с субстратом, в лунки предметного стекла вносится античеловеческий иммуноглобулин, меченный флюоресцентной меткой, с помощью которой визуализируются клеточные структуры, связавшие АНА сыворотки крови больного. Результат оценивается с помощью люминесцентного микроскопа, причем учитывается не только титр разведения сыворотки, но и тип свечения.

В 1961 для обнаружения АНА Бек (Beck) впервые использовал криосрезы тканей крысы в качестве субстрата [8]. Этот тест более известен в нашей стране под названием “антинуклеарный фактор”. Этот метод позволяет получить полуколичественный результат, определяющий максимальный титр сыворотки пациента, при котором отмечается свечение клеточных ядер. Антинуклеарный фактор – основной тест, используемый в России для обнаружения АНА в клинике. Среди его недостатков можно отметить низкую чувствительность этого теста в целом, а также то, что использование тканей лабораторных животных не позволяет четко определить тип свечения и установить присутствие в сыворотке некоторых разновидностей АНА, что существенно снижает чувствительность теста. Тем не менее, по сложившейся традиции, мы считаем возможным сохранить название антинуклеарный фактор (АНФ) для обозначения

ния АНА, выявленных с помощью реакции непрямой иммунофлюоресценции.

Уже при первом опыте клинического применения АНФ с использованием криосрезов тканей лабораторных животных в качестве субстрата было отмечено, что сыворотка больных по-разному "окрашивала" ядра клеток, т.е. флюоресцировали различные субклеточные структуры клеточных ядер. Этот феномен привел к описанию так называемых типов окрашивания или типов свечения ядер в иммунофлюоресцентном тесте. Каждая разновидность АНФ имеет конкретные клеточные мишени, вследствие чего тип свечения ядра, ядрышка и цитоплазмы отражает взаимодействие АНА сыворотки больного с определенными антиген-содержащими структурами внутри клетки. Тип свечения зависит от присутствия конкретных аутоантител в сыворотке крови больного, на основе чего можно сделать предварительное заключение относительно тех разновидностей АНА, которые имеются в данной сыворотке. Применение гистологических срезов не позволяет достоверно установить тип свечения, что заставило искать более подходящий субстрат для решения этой задачи.

Использование клеточных линий значительно эффективнее применения крысиных срезов в связи с гомогенностью клеток, отсутствием тканевого мат-

рикса и большей чувствительностью. Среди клеточных линий, в свою очередь, лучшим субстратом признана клеточная линия НЕр-2, которая существенно улучшает чувствительность теста за счет яркой флюоресценции даже при значительных разведениях сыворотки больного, а большое, богатое эухроматином ядро позволяет точно описать тип свечения [31]. Кроме того, применение клеточной линии НЕр-2 способствует обнаружению антител против Ro/SS-A, которые не выявляются при использовании других субстратов. Среди других преимуществ НЕр-2 можно отметить высокую частоту деления клеток, позволяющую выявлять антитела к антигенам, экспрессирующимся только при делении клетки, и отсутствие клеточного матрикса ткани, затрудняющего визуализацию специфического свечения при сравнении с гистологическими срезами [11].

На сегодняшний день описано более 40 типов свечения ядра клетки, но в практической работе обычно используется всего шесть: гомогенный, периферический, гранулярный (мелко-/крупно-), ядрышковый, центромерный и цитоплазматический. Описание типов свечения представляет ценную клиническую информацию само по себе, кроме того, тип свечения может указывать на необходимость проведения дополнительных лабораторных тестов (табл. 3).

Табл.3. ТИП СВЕЧЕНИЯ ПРИ НЕПРЯМОЙ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ И НАЛИЧИЕ АНА

Тип свечения	Специфичность антитела	Характеристика антигена	Заболевание
Гомогенный/ периферический	ДсДНК Гистоны	ДНК хроматина Н1, Н2А, Н2В, Н3 и Н4,	СКВ Лекарственная СКВ
Периферический	Ламины ядра	Ламины А,В,С	Аутоиммунный гепатит
Крупногранулярный	Sm  RNP PCNA/Ga	Белки В',В,Д,Е,Ф, связанные с U1-U6 RNP Белки А и С, связанные с U1RNP 36 кДа; белок, связанный с ДНК полимеразой дельта	Маркер СКВ СКВ, СЗСТ СКВ
Мелкогранулярный	Ro/SS-A  La/SS-B  Scl-70  PCNA	52, 60 кДа, связанный с Y1-Y5 RNA 48 кДа, связан с РНК полимеразой 3 70кДа антиген, фрагмент топоизомеразы-1 Белок, ассоциированный с ДНК полимеразой δ	СШ, СКВ  СШ СС СКВ
Центромерный	Антицентромерный	CENP А,В,С	CREST
Ядрышковый	Крупногранулярный Мелкогранулярный Точечный	Фибриллярин РНК полимеразы 1 PM-1 (PM/Scl)	СС СС ПМ/ДМ, СС
Ядрышковый, в зависимости от клеточного цикла	Ku	Белки ядерного матрикса 70 и 80 кДа	СКВ
Цитоплазматический	ASM AMA  анти Jo-1, PL-7, PL-12 etc	F-актин Пируват декарбоксилазный комплекс тРНК синтазы	Аутоиммунный гепатит  Первичный билиарный цирроз ПМ/ДМ

Примечание: сокращения см. табл.2

Гомогенный тип свечения предполагает наличие антител против нуклеопротеинов или антител к гистонам, антител к дсДНК и других хроматин-ассоциированных антигенов. Он встречается у больных с СКВ и лекарственной волчанкой, а также у больных со склеродермией.

Периферический тип свечения обнаруживается у больных с антителами к ядерной мембране и выявляется преимущественно у больных с СКВ.

Гранулярный тип встречается наиболее часто и обладает наименьшей специфичностью, так как характерен для сыворотки больных, содержащей множество разновидностей АНА, таких, как АНА против Sm, pRNP, La/SSB, PCNA-1 [30]. Кроме того, гранулярный тип преобладает в сыворотках крови у клинически здоровых лиц, имеющих АНФ.

Нуклеолярный (ядрышковый) тип флюоресценции определяется у больных с СС при наличии антител к компонентам ядрышка, таким как РНК полимеразы 1, U<sub>3</sub>RNP, PM/ScI [10].

Центромерный тип флюоресценции отмечается при появлении антител к центромерам хромосом. Он обнаруживается только в делящихся клетках. Его присутствие характерно для CREST варианта склеродермии [33].

Цитоплазматический тип свечения указывает на антитела к тРНК-синтетазам, в частности Jo-1. Кроме того, он отмечается у больных с аутоантителами, направленными против других компонентов цитоплазмы клетки, например, антител к актину при аутоиммунном гепатите, антител к митохондриям при первичном билиарном циррозе.

Если при использовании иммунофлюоресцентного теста у больного был обнаружен АНФ, то совсем не обязательно, что дальнейшее иммунологическое обследование установит конкретную разновидность АНА. Это связано с разнообразием АНА и несовершенством используемых методов. Иммунофлюоресцентный тест стоит особняком среди других методов выявления АНА, так как результаты позволяют принципиально решить, есть ли у больного аутоантитела, либо их нет.

### **Двойная иммунодиффузия и контрэлектрофорез**

Двойная иммунодиффузия по Оухтерлони является сравнительно грубым методом определения специфичности аутоиммунной сыворотки. Метод основан на преципитации комплексов антиген – антитело в агарозном геле. Сыворотка больного и референтные сыворотки, в каждой из которых содержатся антитела только одной специфичности, располагаются в агарозных лунках поблизости от лунки с антигеном. В качестве антигена используются водно-солевые экстракты клеточных линий или ткани, содержащие смесь ядерных антигенов. Наиболее часто используется экстрагируемый ядерный антиген

(ЕНА), представляющий собой ядерный экстракт из клеточной линии HEp-2 с примесью экстракта тимуса кролика, обеспечивающего достаточное содержание Ro/SS-A антигена. Через 24-48 часов антитела и антигены диффундируют из лунок навстречу друг другу с образованием линий преципитации. После окрашивания геля регистрируют наличие линии преципитации антигена и сыворотки больного, а также проводят ее сопоставление с линией преципитации референтной сыворотки. Если линия преципитации сыворотки больного представляет собой продолжение линии преципитации сыворотки прототипа с известной антигенной специфичностью, то у больного имеются АНА той же разновидности, что и антитела в референтной сыворотке. Если же линии преципитации не сливаются, то в сыворотке больного нет антител данной специфичности.

Двойная иммунодиффузия является относительно слабо чувствительным методом по сравнению с другими тестами по выявлению АНА, требуя больших количеств антител (до 100 мкг) для образования видимых линий преципитации [22]. Однако ее сравнительно низкая чувствительность обеспечивает высокую специфичность этого метода для выявления АНА. Метод двойной иммунодиффузии не требует использования специальных приборов или наборов высокоочищенных антигенов, что представляет значительные преимущества для клинического применения. Однако длительность теста и низкая чувствительность существенно ограничивают его применение.

Для обнаружения АНА контрэлектрофорез был впервые применен Kurata и Tan в 1976 году [23]. Этот метод является разновидностью иммунодиффузии, позволяющей достигнуть сокращения времени реакции и добиться большей чувствительности. Электромагнитное поле, воздействующее на гель, значительно ускоряет время диффузии белков. Метод требует значительно меньших количеств антител и антигена (0,01-0,05 мг), но, как и двойная иммунодиффузия, позволяет получить только качественный результат. Двойная иммунодиффузия и контрэлектрофорез завоевали свое место в лабораторной практике благодаря своей относительной дешевизне.

### **Имуноферментный метод**

Имуноферментный анализ (ИФА) является высокочувствительным методом для выявления конкретных разновидностей АНА. Разведения сыворотки инкубируют в лунках полистирольного или поливинилового 96-луночного планшета, дно которых покрыто рекомбинантным либо очищенным антигеном. Связавшиеся с антигеном антитела сыворотки больного идентифицируются с помощью античеловеческой сыворотки, конъюгированной с ферментом. Активность фермента в отношении хромогенного

субстрата дает возможность судить о концентрации аутоантител. Использование стандартов, содержащих известные количества АНА, позволяет построить калибровочную кривую для вычисления их количественного содержания в сыворотке крови пациента.

Данный метод позволяет быстро и надежно получить количественный результат относительно содержания АНА в крови больного. На сегодняшний день ИФА представляет собой основной метод для определения АНА в небольших клинических лабораториях. Хотя его достоинства неоспоримы, ИФА не лишен недостатков. Методы очистки антигена способны в определенной степени изменить антигенную структуру, что приводит к значительным вариациям в специфичности и чувствительности коммерческих наборов для ИФА. Воспроизводимость результатов и стандартизация наборов в этом случае составляют основу качества клинического анализа, что требует решения вопроса о внутри- и межлабораторном контроле качества. Для получения сравнимых результатов рекомендуется использование реагентов одного производителя.

Необходимо отметить иммуноферментные тест-системы, позволяющие проводить скрининговое обследование для обнаружения АНА. Отличие тест-систем для скрининга состоит в том, что в инкубационную лунку помещается смесь антигенов - ядерный экстракт (ЕНА). Положительный результат такого теста указывает на наличие у больного одной или сочетания нескольких разновидностей АНА. Отрицательный результат такого теста более чем в 95% случаев позволяет исключить СКВ, лекарственную волчанку, СШ, СЗСТ, СС, ДМ/ПМ. Однако использование смеси антигенов, а не одного очищенного антигена, приводит к увеличению частоты ложноположительных результатов. С другой стороны, при выделении антигена утрачивается большое количество конформационных и межмолекулярных антигенных доминант. Эта особенность скрининговых иммуноферментных тест-систем не позволяет им заменить непрямую иммунофлюоресценцию для первичного скрининга пациентов, и после положительного результата такого скринингового обследования все же необходимо выполнить подтверждающий иммунофлюоресцентный тест, а затем соответствующие специфические тесты. Так как зарубежные коммерческие наборы для иммуноферментного определения АНА являются достаточно дорогостоящими, мы считаем, что их применение рационально только после положительного результата иммунофлюоресцентного теста.

На практике получили широкое распространение комбинированные иммуноферментные системы выявления АНА. В ходе одного теста выявляются антитела к основным разновидностям АНА - Sm, SSA/Ro, SSB/La, snRNP, Scl-70, Jo-1. Это позволяет од-

новременно провести широкое тестирование аутоантител, маркеров основных аутоиммунных заболеваний соединительной ткани. Надо учитывать, что они обычно не включают в свой состав определение антител против dsДНК, которые выполняются отдельно. Эти комбинированные тесты дают лишь качественный или полуколичественный результат, что позволяет решить вопрос о спектре АНА в сыворотке больного.

### Иммуноблоттинг

Иммуноблоттинг представляет собой один из весьма чувствительных и специфичных методов анализа антигенной специфичности антител сыворотки больного. Он позволяет обнаружить сывороточные антитела к антигенам определенной молекулярной массы, что дает возможность подтвердить и охарактеризовать наличие у больного редких разновидностей АНА. Данный метод не требует высокоочищенных антигенов, референтных и контрольных сывороток. За счет этого иммуноблоттинг существенно превосходит все вышеперечисленные методы выявления АНА, результаты которых зависят от стандартизации, чувствительности, качества субстрата, нестабильности или нерастворимости определенных антигенов.

Метод иммуноблоттинга включает электрофорез ядерного экстракта в полнакриламидном геле, в ходе которого ЕНА фракционируется в соответствии с молекулярной массой антигенов. Далее происходит электроперенос (блоттинг) белкового материала на нитроцеллюлозную мембрану, ковалентно связывающую белковые и небелковые антигены. Мембрана с нанесенными на нее белками инкубируется с исследуемой сывороткой, содержащей АНА. После связывания АНА с соответствующими мишенями комплексы антиген-антитело реагируют с античеловеческой сывороткой, меченой ферментом. На последнем этапе ферментсодержащие комплексы визуализируют с помощью подходящего субстрата с образованием окрашенных нерастворимых продуктов ферментативной реакции в месте расположения комплексов.

При электрофорезе возможно разрушение определенных конформационных эпитопов, что несколько снижает чувствительность метода. Кроме того, иммуноблоттинг позволяет получить только качественный результат, требует значительного опыта и весьма трудоемок.

Ряд фирм предлагает коммерческие наборы по определению АНА с помощью иммуноблоттинга, куда входят антигены, уже нанесенные на нитроцеллюлозную мембрану. Необходимо отметить, что чувствительность иммуноблоттинга все же ниже по сравнению с иммунофлюоресценцией и ИФА, в связи с чем он должен применяться в комплексе с другими методами.

### Тесты по определению антител к дсДНК

Определение антител к дсДНК имеет крайне важное клиническое значение в диагностике СКВ, но сопряжено с определенными методическими сложностями. Антитела к дсДНК направлены на фосфодиэфирный скелет ДНК. Характерно, что сродство аутоантител к дсДНК не зависит от конформации молекулы и нуклеотидной последовательности ДНК. Взаимодействие между паратопом аутоантитела и ДНК основано, прежде всего, на электростатических связях и чрезвычайно чувствительно к рН и концентрации солей в растворе. В связи со множеством конформационных эпитопов молекулы ДНК, несущих значительный заряд, выявление антител к дсДНК имеет определенные технические особенности. Антитела к дсДНК перекрестно реагируют с односпиральной ДНК (осДНК), что затрудняет интерпретацию результатов теста при использовании дсДНК, загрязненной осДНК. Антитела осДНК, встречающиеся при различных аутоиммунных и инфекционных заболеваниях – СКВ, лекарственной волчанке, ревматоидном артрите, хроническом активном гепатите и инфекционном мононуклеозе, распознают денатурированные одноцепочечные фрагменты дсДНК. Для подтверждения антигенной специфичности антител к дсДНК используются различные методы, в частности обработка S1 нуклеазой, которая разрушает осДНК в препаратах двухцепочечной ДНК. В ИФА тестах для обнаружения антител к ДНК дно лунок предварительно покрывается протамином, сывороточным белком, несущим значительный положительный заряд, позволяющий связывать отрицательно заряженные молекулы ДНК. К сожалению, дсДНК имеет свойство деспирализоваться, особенно в том случае, когда она прикреплена к положительно заряженному протамину на пластиковых поверхностях, что приводит к тому, что большинство твердофазных иммуноферментных систем для обнаружения антител к дсДНК оказываются относительно неспецифичными. Это заставляет вычислять косвенные показатели, позволяющие судить о содержании антител к дсДНК через соотношение концентрации антител к осДНК и всего пула антител к ДНК.

В качестве скрининга, позволяющего определить приблизительное содержание антител к дсДНК, используется метод непрямой иммунофлюоресценции на кинетохоре простейшего жгутикового микроорганизма *Crithidia luciliae*. Кинетопласт жгутика состоит из гигантской митохондрии, содержащей плотно упакованную кольцевую суперспиральную молекулу ДНК, без ассоциированных РНК и нуклеопротеинов, которая представляет идеальный субстрат для непрямой иммунофлюоресценции. Обладая несформированным ядром, *C. luciliae* является плохим субстратом для выявления АНА, но при наличии у больного антител к дсДНК, реагирующих с ДНК в

кинетопласте, определяется яркая флюоресценция на конце клетки, несущем жгутик.

Наилучшие результаты при определении антител к дсДНК дает использование радиоиммунного теста, известного как тест Фарра (Farr test). Этот метод представляет собой разновидность радиоиммунопреципитации, где в качестве антигена используется дсДНК, меченная радиоактивным изотопом. Реакция связывания антител с антигеном осуществляется в жидкой фазе, что позволяет предотвратить деспирализацию ДНК. Этот метод основан на осаждении иммунных комплексов дсДНК и антител к дсДНК с помощью насыщенного раствора сульфата аммония. Преципитат многократно отмывается, и содержание радиоактивной метки считается в счетчике радиоактивности. Результат теста выражается либо в проценте связывания дсДНК, либо в единицах радиоактивности. Тест Фарра используется в качестве “золотого стандарта” количественного определения антител к дсДНК благодаря его высокой точности. Применение растворимых форм дсДНК предотвращает деспирализацию и контаминацию осДНК, что обеспечивает высокую специфичность и надежность этого анализа. Этим методом измеряется преимущественно содержание высокоаффинных антител к дсДНК. Использование тестов, основанных на радиоиммунном анализе (РИА), требует специального оборудования и обученного персонала, что ограничивает их клиническое распространение.

Среди всех методов выявления антител к дсДНК наиболее чувствительными, но относительно неспецифичными являются тесты, основанные на ИФА. Иммунофлюоресценция на *C. luciliae* представляет собой высокоспецифичный, но нечувствительный метод. Это позволяет использовать иммунофлюоресценцию для первичного скрининга и полуколичественного определения концентрации антител к дсДНК, после чего необходимо применение более чувствительного теста Фарра. Иммунофлюоресцентный тест на *C. luciliae* и радиоиммунный тест Фарра при совместном использовании являются наиболее эффективными инструментами для выявления антител к дсДНК и мониторинга их содержания в сыворотке больного СКВ.

Надо помнить, что гомогенный или периферический тип свечения у больного с подозрением на СКВ обычно обусловлен антителами к дсДНК.

## Диагностическое значение АНА

### Системная красная волчанка

Основным серологическим тестом в иммунологическом обследовании больных с подозрением на заболевание соединительной ткани в настоящее время является выявление АНФ с помощью метода непрямой иммунофлюоресценции [37]. Высокочувствительный тест с использованием клеточной ли-

нии HEp-2 выявляет АНФ более чем у 98% больных с СКВ, что позволяет использовать обнаружение АНФ в качестве самостоятельного 11-го классификационного критерия пересмотренных критериев СКВ 1982 года Американской Ассоциации Ревматизма (табл.4) [36].

При применении клеточной линии HEp-2 в качестве субстрата для обнаружения АНФ, почти у всех больных с СКВ выявляются значительные титры АНФ ( $>1/160$ ). Обычно в клинических лабораториях титр  $1/40$  и более указывает на присутствие диагностически значимого содержания АНФ. Необходимо принять во внимание, что приблизительно у 5-10% здоровых женщин удается хотя бы однократно обнаружить АНФ в титре, равном или превосходящем  $1/160$ , а титр  $1/40$  встречается у 10% здоровых женщин [20]. При использовании гетерологичных тканей, таких как почка или печень крысы, у 5-10% больных, удовлетворяющих критериям диагноза СКВ, АНФ не определяются или титры их очень низки. Этим больным условно относят к группе "АНФ-негативной СКВ", для уточнения диагноза у таких больных требуется дальнейшее обследование, речь о котором пойдет ниже.

Применение в качестве субстрата клеточной линии HEp-2 значительно сокращает численность этой категории пациентов. В группе "АНА-негативных" больных СКВ, при использовании других лабораторных методов выявления АНА, нередко определяют антитела, направленные против Ro/SSA или dsDNA.

#### Антитела к антигенам хроматина

**Антитела к dsDNA.** Антитела к dsDNA специфичны для СКВ и могут обнаруживаться приблизительно у 40-70% больных [24]. Антитела к dsDNA являются высокоспецифичным маркером СКВ, что позволяет широко их использовать в диагностике этого заболевания. Антитела к dsDNA включены в

состав 10-го критерия ARA, совместно с обнаружением антител к Sm антигену, LE-клеток и антител к кардиолипину или ложнопозитивной реакцией Вассермана (табл.4).

В качестве скринингового теста для выявления антител к dsDNA применяется либо ИФА, либо реакция непрямой иммунофлюоресценции на *S. luciliae*. Результаты скрининга подтверждаются с помощью теста Фарр. При обследовании больных с уже установленными позологическими формами, специфичность обоих тестов при диагностике активных форм СКВ приближается к 80-90%.

Антитела к dsDNA ответственны за развитие волчаночных васкулитов и люпус-нефрита [34]. Титры антител к dsDNA тесно коррелируют с концентрацией IgG-содержащих ЦИК в сыворотке крови больных СКВ. Классические исследования элюатов из почечных клубочков больных, умерших от СКВ, указывают на значительно большую концентрацию антител к dsDNA в элюате по сравнению с их концентрацией в сыворотке [18]. Это позволило заподозрить важность иммунных комплексов, содержащих антитела к dsDNA, в патогенезе поражения почек при СКВ. Обнаружение способности как одно-, так и двуспиральной ДНК связываться с базальной мембраной клубочка свидетельствовало в пользу теории об иммунокомплексном поражении почки при СКВ, с образованием иммунных комплексов *in situ*, активацией комплемента и потреблением его сывороточных резервов, развитием воспалительных инфильтратов, приводящих к *lupus nephritis*.

Выявление антител к dsDNA и гипокомплементемии представляют собой незаменимые диагностические тесты, выявляющие категорию больных с высоким риском развития волчаночного гломеруло-нефрита. Имеется прямая корреляция между нарастанием титра антител к dsDNA, выраженностью гипокомплементемии и тяжестью волчаночного нефрита.

Табл.4. ПЕРЕСМОТРЕННЫЕ КРИТЕРИИ СКВ 1982 ГОДА АМЕРИКАНСКОГО КОЛЛЕДЖА РЕВМАТИЗМА (ARTHRITIS RHEUM 1982; 25:1271-1277)

1.	Симптом волчаночной бабочки
2.	Дискоидные поражения кожи
3.	Фоточувствительность
4.	Безболезненные изъязвления во рту или носоглотке
5.	Неэрозивный артрит 2-х и более суставов
6.	Серозит(плеврит/перикардит)
7.	Поражение почек (протеинурия $>0.5\text{г/л}$ или цилиндрурия)
8.	Поражения ЦНС (судороги или психоз)
9.	Гематологические проявления (гемолитическая анемия с ретикулоцитозом, лейко/лимфо/тромбоцитопения)
10.	Результаты иммунологических исследований ( LE+, анти dsDNA, анти Sm, ложно положительная РВ)
11.	Антинуклеарные антитела

Предложенная классификация основывается на 11 критериях, для постановки диагноза СКВ требуется наличие (одновременно либо последовательно) 4 из перечисленных 11 критериев.

Практически у всех больных с активными почечными формами СКВ отмечаются антитела к дсДНК. У больных СКВ с повышенным содержанием высокоаффинных антител к дсДНК, имеется риск развития волчаночного гломерулонефрита. Однако надо заметить, что аффинность антител к дсДНК в сыворотке представляет собой постоянно меняющуюся величину. Так, непосредственно при обострении гломерулонефрита содержание высокоаффинных антител в сыворотке больного весьма незначительно, однако в элюатах из почечных клубочках отмечается повышенное содержание высокоаффинных антител. Во время ремиссии титры высокоаффинных антител к дсДНК постепенно возрастают, и их сывороточные уровни максимальны непосредственно перед вспышкой гломерулонефрита [40].

Особая роль в ведении больных СКВ отводится мониторингу содержания антител к дсДНК для профилактики обострений [13]. При этом динамике концентрации антител к дсДНК придается большее прогностическое значение по сравнению с их абсолютным содержанием. Нарастание титра антител к дсДНК (удвоение титра в течение 3 месяцев) и гипокплементемия предшествуют развитию гематурии и протеинурии в 90% наблюдений. Биопсия почек на фоне увеличения концентрации антител к дсДНК почти всегда выявляет наличие значительных иммуноопосредованных альтераций даже до появления клинической симптоматики. Увеличение титра антител к дсДНК в течение нескольких недель является предвестником вспышки СКВ, что может быть установлено при ежемесячном мониторинге их концентрации в сыворотке крови. Раннее распознавание этих состояний с последующей активной иммуносупрессивной терапией может играть важную роль в снижении смертности и инвалидизации у больных с поражением почек при СКВ. Больным с прогрессирующим нарастанием титра антител к дсДНК рекомендуется профилактическая терапия вплоть до снижения титра и восстановления нормальной концентрации компонентов комплемента в сыворотке крови.

Ряд современных исследований, выполненных для оценки значимости мониторинга антител к дсДНК, указывают на то, что активная профилактическая терапия в ответ на повышение титра антител к дсДНК, при условии динамического ежемесячного контроля, снижает количество обострений при СКВ, что ведет к улучшению прогноза [17].

**Антитела к осДНК.** Антитела к осДНК встречаются приблизительно у 70% больных с СКВ. Хотя эти антитела неспецифичны для СКВ, их регулярное обнаружение в элюатах из почечных клубочков больных СКВ, умерших от гломерулонефрита, может свидетельствовать о роли антител к осДНК в патогенезе поражения почек при волчаночном нефрите. При других заболеваниях

соединительной ткани они также отмечаются достаточно часто. Кроме того, антитела к осДНК могут быть обнаружены при множестве других патологических состояний - массивной травме, вирусных инфекциях, а также у клинически здоровых людей.

Обнаружение в сыворотке больного антител к осДНК класса IgM имеет значение для диагностики дискоидной красной волчанки (ДКВ). При этой клинической форме, сопровождаемой появлением антител к осДНК, по сравнению с ДКВ без этих антител, отмечается высокая частота развития системного заболевания в виде генерализованной формы СКВ. Приблизительно 25-50% больных с изолированными кожными формами волчанки без АНФ имеют значительный титр антител к осДНК класса IgM [16]. Такие пациенты относятся к группе "АНФ негативной" волчанки и требуют дальнейшего лабораторного обследования.

**Антитела к гистонам.** Эти антитела реагируют с протеиновыми составляющими нуклеосом, каждая из которых состоит приблизительно из 140 пар оснований ДНК, обернутой вокруг ядра из белков-гистонов H2A, H2B, H3 и H4, а H1 покрывает ДНК в промежутках между нуклеосомами [19]. У 70% больных СКВ аутоантитела направлены к гистонам H1 и H2B [21], в то время как АНА к другим типам гистонов наблюдаются значительно реже. Для выявления антител к гистонам используется ИФА или иммуноблоттинг.

Высокие титры антител к гистонам характерны для лекарственной волчанки. Лекарственно-индуцированная волчанка является результатом побочного действия фармацевтических препаратов. Среди препаратов, приводящих к формированию синдрома лекарственной волчанки, чаще других отмечаются апрессин, хинидин, прокаинамид, хлорпромазин и изониазид. Синдром характеризуется развитием люпоидноподобного заболевания с лихорадкой и полисерозитом. Лекарственно-индуцированная волчанка, как правило, протекает без поражения почек. С другой стороны, при лекарственно-индуцированной волчанке наблюдается полное отсутствие других классических иммунологических маркеров СКВ, как-то антител к дсДНК, Sm. Кроме того, наблюдается нормальное содержание компонентов комплемента в плазме крови. При лекарственной волчанке выявляются очень высокие титры АНФ, и почти у всех пациентов имеются антитела к гистонам. Отмена лекарственного препарата приводит к снижению титров аутоантител и их исчезновению из сыворотки крови.

#### **Антитела к рибонуклеопротеинам**

Антитела к рибонуклеопротеинам, включающие анти-Sm, анти-snRNP(U1RNP), анти-Ro/SS-A, анти-La/SS-B, суммарно встречаются при СКВ чаще



чем антитела к дсДНК. Антитела к Ro и La были первыми описанными разновидностями АНА [6].

Концентрация этих антител в крови необычайно высока. Так, например, в одном из исследований было показано, что приблизительно 20% всей гамма-глобулиновой фракции больного с СКВ направлено против snRNP [14]. За счет этого антитела к рибонуклеопротеинам могут определяться относительно низкочувствительными методами, такими как иммунодиффузия и контрэлектрофорез [27]. Антитела к рибонуклеопротеинам определяют группу больных СКВ, у которых ведущим клиническим проявлением является поражение кожи. Хотя поражения почек у этих больных не исключено, но частота волчаночного гломерулонефрита в этой группе больных гораздо ниже, чем при анти-дсДНК позитивной волчанке.

Антитела к рибонуклеопротеинам в иммунофлюоресцентном тесте обычно характеризуются гранулярным типом свечения. Их концентрация не зависит от фазы заболевания и повторного определения их содержания не требуется.

**Антитела к Sm антигену.** В 1966 году Tan и Kunkel описали систему Sm антигенов (антиген Смита), реагирующих с антителами из сыворотки больной по фамилии Smith [38]. В настоящее время установлено, что Sm антиген образуют около 9 белков, ассоциированных с РНК, которые входят в состав сплайсосомы - белкового комплекса, осуществляющего перестройку мРНК.

Антитела к Sm антигену отмечаются приблизительно у 20-30% больных СКВ. Имеются указания на их низкую встречаемость (не более 10%) в европейской популяции. Антитела к Sm встречаются в основном у представителей африканской и азиатской рас. Важность выявления антител к Sm антигену при СКВ обусловлена их абсолютной специфичностью при этом заболевании, что явилось причиной включения этой разновидности АНА, наряду с антителами к дсДНК и LE клетками, в 10-й критерий СКВ (табл. 4). В настоящее время большинство ИФА систем для обнаружения антител к Sm основаны на рекомбинантных антигенах.

Только в редких случаях антитела к Sm антигену обнаруживаются изолированно и обычно выявляются в комбинации с антителами к snRNP, но редко вместе с антителами к Ro/SS-A. Клиническими при-

знаками, связанными с наличием Sm антител, являются, прежде всего, более агрессивное течение заболевания, поражение центральной нервной системы, волчаночные психозы и относительная сохранность функции почек.

**Антитела к snRNP (U1 RNP).** Антитела к U1sn RNP направлены против белков в А, С и К, входящих в состав рибонуклеопротеина, содержащего U1 малую ядерную РНК в составе сплайсосомы [25]. Антитела к snRNP встречаются приблизительно у 35% больных с СКВ (табл.5). Считается, что эти антитела специфичны для гетерогенной группы больных с признаками прогрессивного СС, СКВ и дерматомиозита. Это заболевание носит название "смешанное заболевание соединительной ткани" или синдром Шарпа (Sharp) [35]. Клиническая картина при СЗСТ представлена разнообразными признаками склеродермии и СКВ. Они включают синдром Рейно, склеродактилию, нарушения моторики пищевода и поражения легких, миозит, напоминающий таковой при полимиозите, недеформирующий артрит и полисерозит. СЗСТ характеризуется редкостью поражения ЦНС и сохранностью функции почек, хорошим ответом на низкие дозы глюкокортикоидов и, в целом, благоприятным прогнозом. Это заболевание представляет собой частный случай так называемых перекрестных синдромов, сочетающих клиническую картину различных заболеваний соединительной ткани, речь о которых пойдет ниже.

Существует несколько наборов диагностических критериев СЗСТ, в основе которых лежит наличие антител к snRNP в сыворотке крови. Однако большинство исследователей признают, что клинические признаки у больных с антителами к snRNP обычно удовлетворяют классическим классификационным критериям СКВ, однако у них наблюдаются своеобразные клинические формы ее течения. По всей видимости, СЗСТ представляет определенный этап в развитии заболевания, после чего заболевание трансформируется в конкретную клиническую форму – СКВ, СС, ревматоидный артрит, полимиозит. Совместно с антителами к snRNP в 50% случаев выявляется ревматоидный фактор, реже антитела к другим рибонуклеопротеинам, таким как Sm, Ro и La, а также антитела к дсДНК и антицентромерные антитела. [32].

У больных СКВ с антителами к snRNP присутствует синдром Рейно, признаки миозита и склеро-

Табл. 5. ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ АНТИТЕЛ К SN-RNP (U1RNP).

Популяция больных	Комментарий
СЗСТ	Сочетание миозита, склеродермии и волчанки
СКВ	Часто синдром Рейно, реже поражение почек
Синдром врожденной красной волчанки (AV блокада)	Ребенок от snRNP-позитивной матери
Склеродермия	Около 5% больных snRNP-позитивны
Полимиозит	Около 10% больных snRNP-позитивны

дактилия. Приблизительно у 5-10% больных с классическими признаками прогрессивного СС и некоторых больных с полимиозитом присутствуют антитела к snRNP. У snRNP позитивных матерей наблюдается высокий риск рождения ребенка с кожными признаками синдрома врожденной волчанки и врожденной AV блокады [15]. Поражение почек также может встречаться у больных с антителами к snRNP, хотя его встречаемость значительно ниже, чем частота поражения почек у больных с антителами к dsДНК. Тесты, направленные на обнаружение антител к snRNP, должны проводиться у всех больных, позитивных по АНФ.

**Антитела к Ro/SS-A.** Антитела Ro/SS-A направлены против ядерных рибонуклеопротеинов 60 кДа и 52 кДа, с которыми связаны Y1-Y5 цитоплазматические РНК, транскрибируемые РНК-полимеразой III [9].

Антитела к Ro/SS-A могут быть выявлены всеми стандартными тестами для обнаружения АНА. Антитела к Ro/SSA отмечаются приблизительно у 50% больных с СКВ, 70% больных ДКВ, у 60% больных с СШ, у около 30-40% больных с ревматоидным артритом, а также у беременных женщин. Диагностически значимые титры этих антител могут встречаться у 1% здоровых женщин в возрасте 20-45 лет.

Клинические проявления при классической СКВ, сопровождаемой присутствием антител к Ro/SS-A, включают в себя симптомы фоточувствительности, вторичный СШ у 10% больных, поражение легких, лимфопению, реже нефрит, тромбоцитопению и наличие ревматоидного фактора (табл.6). Антитела к Ro/SS-A обычно встречаются в популяции больных СКВ с выраженной симптоматикой фотосенситивных кожных проявлений. Часто такие больные описывают ожоги "сквозь оконное стекло", что свидетельствует о фоточувствительности к низкоэнергетическим длиноволновым ультрафиолетовым волнам.

ДКВ представляет собой фоточувствительный люпоидный дерматит. Поражения кожи располага-

ются преимущественно в местах, подвергшихся действию инсоляции. Они представляют собой небольшие эритематозные папуллы или бляшки при эритематозно-папулезной форме, либо это замкнутые циркулярные эритематозные высыпания при аннулярной полициклической форме. У больных ДКВ отмечается мышечно-суставной синдром, проявляющийся артралгиями либо артритом. Практически в 50% наблюдений у больных с ДКВ при лабораторном обследовании выявляются антитела к Ro/SS-A.

При сравнительно позднем начале развития СКВ (после 50 лет) и вторичном синдроме Шогрена часто наблюдаются антитела к Ro/SS-A. Эта разновидность заболевания характеризуется поражением легких, нейропсихическими проявлениями и реакциями фоточувствительности на фоне нормальной функции почек.

Антитела к Ro/SS-A обнаруживаются у 98% матерей, у которых дети страдают синдромом врожденной волчанки [12]. В основе этого заболевания лежит проникновение через плаценту в кровь новорожденного антител к Ro/SS-A. Основным проявлением врожденной волчанки является дерматоз, напоминающий ДКВ, и ряд системных и гематологических синдромов, включающих врожденную поперечную блокаду, гепатит, гемолитическую анемию и тромбоцитопению. Все беременные с подозрением на СЗСТ должны быть иммунологически обследованы для выявления группы риска врожденной красной волчанки.

**Антитела к La/SS-B.** Они встречаются приблизительно у 10-15% больных с СКВ и около 50% больных с синдромом Шогрена. Антитела к La/SS-B направлены против белков массой 48 и 43 кДа, связанных с транскриптами РНК полимеразы 3. Антитела к La/SS-B в большинстве случаев наблюдаются совместно с антителами к Ro/SS-A, в то время как последние могут встречаться изолированно. Если Ro/SSA встречаются при разных аутоиммунных заболеваниях, то La/SS-B обычно указывают на наличие у больного СШ, хотя иногда встречаются при вол-

Табл.6. КЛИНИЧЕСКИЕ ФОРМЫ СКВ, СОПРОВОЖДАЮЩИЕСЯ АНТИТЕЛАМИ К RO/SS-A.

Клиническая форма	Комментарий
АНА негативная волчанка	2/3 этих больных имеют антитела к Ro/SS-A, фотосенситивный дерматит До 70% больных Ro/SS-A позитивны, нередко отмечается симптоматика синдрома Шогрена 50-75% больных Ro/SS-A позитивны, часто поражения кожи, низкая частота антител к ds ДНК Начало волчанки в возрасте 55лет, почти 90% больных Ro/SS-A позитивны. Кожные, нейропсихические, легочные проявления Клинические признаки СКВ и синдрома Шогрена, низкая частота поражения почек, часто кожные проявления 98% матерей обладают антителами к Ro/SS-A Около 10% больных с полимиозитом
Подострая кожная волчанка	
Волчаноподобный синдром, связанный с недостаточностью факторов комплемента C2 или C4 СКВ с поздним началом	
СКВ с синдромом Шогрена	
Врожденная красная волчанка Миозит	

чанке, протекающей с выраженными проявлениями вторичного СШ.

### Другие разновидности АНА при СКВ

Антитела к PCNA-1 (proliferating cell nuclear antigen-1) взаимодействуют с белком, участвующим в контроле клеточного цикла. Антитела к нему обнаруживаются у 3% больных с СКВ и не встречаются при других ревматических заболеваниях. У больных СКВ с антителами к PCNA-1 наряду с типичными признаками волчанки чаще выявляется диффузно-пролиферативный гломерулонефрит, поражение центральной нервной системы и тромбоцитопения. Характерно, что у больных с нейропатией и антителами к PCNA-1 нет антител к дсДНК. Мониторинг содержания антител показал, что увеличение титра антител к PCNA-1 сопутствует обострению гломерулонефрита, и стероидная терапия снижает их титр.

Антитела к рибосомальному белку Р встречаются у 10-20% больных с СКВ. Эти антитела взаимодействуют с фосфоропотеинами рибосом и встречаются преимущественно у больных СКВ с поражением центральной нервной системы [39]. Антитела к рибосомам выявляются при использовании флуоресцентного теста и характеризуются свечением ядра и цитоплазмы клетки. Они отмечаются у 20% больных с СКВ, их обнаружение специфично для СКВ, протекающей с волчаночным психозом.

### АНА в алгоритме лабораторного обследования больных СКВ

Иммунологические тесты, основанные на выявлении АНА, даже будучи единственными находками у больного, составляют два критерия СКВ из че-

тырех требуемых (табл.4). Это позволяет с высокой достоверностью поставить диагноз СКВ при скудной или разнородной клинической картине. Их применение, объективизируя изменения, происходящие в организме, обеспечивает необходимую основу для подтверждения диагноза, что делает их использование чрезвычайно ценным для клинициста.

Основные подходы к лабораторному обследованию больных СКВ отражены в табл. 7 и табл.8.

Первичная диагностика СКВ основана на АНФ. Скрининговые тесты, основанные на ИФА, несколько дороже, но позволяют с очень высокой вероятностью исключить ревматологическое заболевание.

Подтверждение диагноза системного заболевания соединительной ткани требует выполнения АНФ с подробным описанием типа свечения, что, наряду с клиническими данными, позволит назначить дальнейшее иммунологическое обследование. Так, выявление яркого гомогенного окрашивания в высоком титре у больного с волчаночным нефритом должно навести на мысль о присутствии антител к дсДНК. У больных с подозрением на СКВ необходимо выполнять тесты, имеющие наибольшую диагностическую значимость, в то время как у больных с установленной СКВ должны выполняться тесты, направленные на мониторинг вспышек заболевания.

Стоит напомнить о значении других иммунологических тестов, направленных на диагностику СКВ, таких как увеличение СОЭ, стабильно невысокие уровни СРБ, гипергаммаглобулинемия, присутствие LE-клеток, а также важность анализа биопсий почек и кожи методом прямой иммунофлуоресценции. Комбинация различных иммунологических методов является мощным диагностическим подспорьем, дополняющим клиническую диагностику волчанки.

Табл.7. ПЕРВИЧНОЕ СЕРОЛОГИЧЕСКОЕ ОБСЛЕДОВАНИЕ БОЛЬНЫХ С ПОДОЗРЕНИЕМ НА СКВ

Тест	Комментарий
Иммунофлуоресценция на HEp-2 с описанием типа свечения	Важен используемый субстрат. При использовании криосрезов крысиных и обезьяньих органов 5-10% антител к Ro/SS-A не выявляется
Антитела к дсДНК	Должны определяться у всех больных с АНА при подозрении на СКВ, особенно при гомогенном/периферическом типе флуоресценции
Антитела к рибонуклеопротеинам (анти-Sm, snRNP, Ro/Ssa, La/SSB)	Должны определяться у всех больных с АНА при подозрении на СКВ
Антифосфолипидные антитела	Имеются приблизительно у 50% больных с СКВ, при концентрации более 20 IU появляется риск развития клинических проявлений АФС
Факторы комплемента (CH50, C3, C4)	Должны определяться у всех больных с АНА при подозрении на СКВ, особенно у больных с поражением почек и антителами к дсДНК

Табл. 8. СЕРОЛОГИЧЕСКОЕ ОБСЛЕДОВАНИЕ ПРИ УСТАНОВЛЕННОЙ СКВ

Тест	Комментарий
Комплемент (СН50), С3, С4	Наиболее чувствительный тест для диагностики поражения почек. Больные с СКВ должны получать терапию до момента нормализации содержания комплемента в сыворотке
Антитела к дсДНК	При эффективной и успешной терапии титр значительно снижается. Ежемесячный мониторинг их концентрации в крови позволяет предсказать надвигающийся рецидив заболевания и агрессивная терапия улучшает долгосрочный прогноз
Антитела к осДНК	Могут быть обнаружены у больных с поражением почек в отсутствии других типов аутоантител. Титр снижается при эффективном лечении
Антитела к рибонуклеопротеинам (Sm, RNP, Ro/SS-A и La/SS-B)	Обычно имеются высокие титры, которые не изменяются при терапии СКВ. Мониторинг не имеет клинического значения, но конкретный спектр АНА указывает на особенность клинических проявления СКВ

### Синдром Шогрена

Синдром Шогрена (Sjogren's syndrome) является хроническим аутоиммунным заболеванием, поражающим слюнные и слезные железы, что приводит к ксеростомии и ксерофтальмии. Его встречаемость у лиц 50-70 лет, в подавляющем большинстве женщин, достигает 5% всей популяции. Часто СШ сопровождается экстраглангулярными проявлениями, в частности васкулитами, а также на его фоне нередко отмечается развитие лимфом. Первичный синдром Шогрена встречается изолированно, но признаки СШ нередко обнаруживаются при ревматоидном артрите, СКВ и других аутоиммунных заболеваниях в виде "сухого синдрома". Так, по некоторым данным, до 20-60% больных с ревматоидным артритом и СС отмечают проявления вторичного СШ.

В основе аутоиммунного поражения при СШ лежит локальная лимфоцитарная инфильтрация экзокринных желез. Использование иммуногистохимических методов значительно улучшает диагностику СШ, позволяя определить конкретный клеточный состав воспалительных инфильтратов. Наряду с воспалительными изменениями желез, СШ характеризуется поли- и олигоклональной активацией В-клеток, проявляющейся гипергаммаглобулинемией, появлением орган-специфических антител к слюнным, щитовидной и поджелудочной железам, париетальным клеткам слизистой желудка. Практически у всех больных отмечается ревматоидный фактор и АНФ.

АНФ при синдроме Шогрена является частой находкой, выявляемой у 95% всех больных [5]. Для СШ наиболее типичен гранулярный тип свечения. Перечень АНА, встречающихся при СШ, включает

антитела против Ro/SS-A, La/SS-B, MA-1, p80 (кой-лин). Антитела к Ro/SS-A и La/SS-B были первыми из описанных разновидностей антинуклеарных антител. Их обнаружение является основой лабораторной диагностики СШ и обладает высокой специфичностью при данном заболевании.

Предполагается, что антигены Ro/SS-A и La/SS-B концентрируются на поверхности клеток эпителия конъюнктивы и желез у больных с СШ. Сходное перераспределение этих антигенов отмечается в клетках перевиваемых линий, пораженных ретровирусами, что позволяет с определенной уверенностью предполагать вирусную этиологию этого заболевания. У больных с антителами к La/SS-B отмечается выраженная инфильтрация слюнных желез плазматическими клетками, синтезирующими аутоантитела. Хотя данных за непосредственное цитопатическое действие АНА при СШ не получено, слюнные железы являются основным местом продукции аутоантител, участвующих в образовании циркулирующих иммунных комплексов и развитии иммунокомплексной патологии.

Антитела к Ro/SS-A изолированно обнаруживаются у 30%, а Ro/SS-A совместно с La/SS-B - у 50% больных. Комбинация обоих разновидностей АНА нередко отмечается в сочетании с высокими титрами ревматоидного фактора, гипергаммаглобулинемией и криоглобулинемией. Для больных с антителами к Ro/SS-A и La/SS-B характерно раннее начало, большая длительность заболевания, выраженное увеличение околоушных слюнных желез и значительная степень лимфоцитарной инфильтрации слюнных желез. Их обнаружение у больного СШ может также прогнозировать развитие таких экстр-

рагландулярных проявлений заболевания, как васкулит, лимфаденопатия, спленомегалия, анемия и лейкопения. Как уже отмечалось, антитела к Ro/SS-A и La/SS-B встречаются у 60% больных с перекрестными синдромами, сочетающими признаки СШ и СКВ.

### Полимиозит/Дерматомиозит

Полимиозит, дерматомиозит и ювенильный дерматомиозит представляют собой аутоиммунные заболевания, характеризующиеся цитотоксическим ответом в отношении компонентов поперечно-полосатой мускулатуры. АНФ выявляется приблизительно у 50-90% больных с аутоиммунными миопатиями, но не у больных с паранеопластическими нейропатиями и другими клиническими синдромами, ассоциированными с воспалительными миопатиями [29]. У 30% больных ДМ/ПМ встречаются антитела к аминоксил-тРНК синтетазам (Jo-1, PL-7, PL-12, EJ и OJ). Антитела, взаимодействующие с Jo-1 антигеном, отмечаются в несколько раз чаще, чем другие антисинтетазные антитела, и именно у больного с ДМ/ПМ они были впервые описаны. Эти антитела реагируют с гистидил-тРНК синтетазой, в то время как остальные антисинтетазные антитела направлены против 4 различных типов тРНК синтетаз - треониновой, аланиновой, глициновой, изолейциновой. Антитела Jo-1 выявляются при использовании более доступных лабораторных тестов, например контрэлектрофореза и ИФА, что позволяет широко применять определение этого типа АНА в лабораторной практике. Тесты, направленные на обнаружение других антисинтетазных антител, в практической работе не используются в связи с редкостью их выявления.

Хотя антисинтетазные антитела не включены в классификационные критерии ДМ, но их обнаружение при соответствующей клинической картине с высокой достоверностью подтверждает диагноз, и в ряде случаев делает не нужной биопсию мышечной ткани. Так как антитела к тРНК синтетазам обладают низкой чувствительностью при ДМ/ПМ, их отсутствие не может опровергнуть диагноз ДМ или ПМ. Антитела к Jo-1 отмечаются у 15-20% больных ПМ и ДМ.

У всех больных с антисинтетазными антителами наблюдается очень сходная клиническая картина,

что привело к выделению так называемого "антисинтетазного синдрома", одной из разновидностей перекрестных синдромов. Он проявляется клинической картиной дерматомиозита, но протекает более активно и требует назначения активной иммуносупрессивной терапии. Около 90% больных с антисинтетазным синдромом страдают симметричным полиартритом, часто отмечается синдром Рейно. Интерстициальное поражение легких или фиброзирующий альвеолит встречается у 50-75% больных с антителами к тРНК синтетазам. Приблизительно у 20% больных с антисинтетазными антителами отмечаются признаки какого-либо другого заболевания соединительной ткани.

### Склеродермия

Впервые АНФ при склеродермии были описаны Tan et al. в 1980 году. После того, как в качестве субстрата непрямо́й иммунофлюоресценции стала использоваться линия HEp-2, более чем у 90% больных системным склерозом были обнаружены антитела к ядерным и ядрышковым компонентам (табл.9). По данным ряда авторов, при обследовании больших контингентов только у 2-3% больных СС отсутствует АНФ [1].

При локализованной склеродермии АНФ отмечаются у 50% больных, преимущественно при линейной склеродермии (40%), несколько чаще при склеродермии у детей (60%). При бляшечной склеродермии АНФ обнаруживаются только у 15% больных, в основном у взрослых.

При склеродермии в качестве антигенов АНА наибольшее значение имеют антигены хроматина, в частности белки центромер (CENP - A,B,C,D), Scl-70 и РНК полимеразы III. Реже отмечаются АНА, направленные против компонентов ядрышка, таких как PM/Scl, U<sub>3</sub>RNP (фибрилларин), РНК полимеразы I, NOR90. Две основные разновидности аутоантител: анти-Scl 70 и антицентромерные антитела встречаются с наибольшей частотой и могут быть признаны как иммунологические маркеры основных клинических разновидностей склеродермии. Антитела к Scl-70 характерны для диффузной и ограниченной склеродермии (кожной), в то время как антицентромерные антитела выявляются при CREST синдроме, сочетающем кальциноз, признаки синдро-

Табл.9. ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ АНА ПРИ СС И ОГРАНИЧЕННОЙ СКЛЕРОДЕРМИИ

Тест	Комментарий
Антитела к центромерам	Отмечаются у 80% больных при CREST синдроме и акросклеротическом типе склеродермии
Антитела к Scl-70	Отмечаются у 70% больных СС
Антитела к PM/Scl	Отмечаются у 5% больных с СС, нередко с признаками миозита
Антитела к U1RNP	Отмечаются у 5% больных с СС, с признаками СКВ и миозита

ма Рейно, эзофагит, склеродактилию и телангиэктазию [26].

Одним из наиболее характерных типов АНА у больных с СС являются антитела, направленные против 70 кДа продукта деградации ДНК топоизомеразы 1 (100-105 кДа). Он обозначается как антиген Scl-70 (ТОРО-1). Эти антитела практически не встречаются при других заболеваниях, но в единичных случаях антитела против Scl-70 могут встречаться у онкологических больных без признаков СС или склеродермии. Антитела к Scl-70 встречаются у 32% родственников больных склеродермией наряду с субклиническими формами различных заболеваний соединительной ткани.

У больных с ограниченной склеродермией с антителами к Scl-70 по сравнению с больными без этих антител отмечается несколько более частая встречаемость рубцовых изменений на коже пальцев, развития центрального склероза и поражения почек и сердца.

У больных ограниченной склеродермией без антител к Scl-70 отмечаются антитела к центромерам. У этой группы пациентов отмечаются типичные клинические особенности CREST синдрома: выраженный кальциноз фасций и сухожилий, отсутствие рубцовых контрактур пальцев, более выраженный отек кожи пальцев. Антицентромерные антитела присутствуют в сыворотке 20% больных с болезнью Рейно, сопровождаемой артралгиями. Основным методом обнаружения антицентромерных антител является иммунофлюоресцентный тест.

В низких титрах (до 1:40) они определяются на митотически неактивных тканях (таких как крысиная печень) и в высоких титрах при использовании клеточных линий (HEp-2), для которых типична большая частота клеточных делений. Они хорошо заметны в ядрах линии HEp-2, благодаря свечению в делящихся клетках, содержащих компактные хромосомы. В ядре клетки флюоресцируют мелкие гранулы если хромосомы находятся в стадии спирализации, либо наблюдается картина веретена деления, подчеркнутого свечением центромер. Основным антигеном является центромерный белок CENP-B.

Антитела к центромерам выявляются у 80% больных с CREST, 10% больных с СС и 10% больных с изолированным синдромом Рейно, а также они нередко встречаются у больных с первичным билиарным циррозом. Они не выявляются у здоровых лиц даже в низких титрах, таким образом, их обнаружение однозначно свидетельствует о заболевании. Антитела к центромерам и антитела к Scl-70 редко встречаются совместно. У больных с антицентромерными антителами реже отмечается поражение внутренних органов, реже встречаются атрофические процессы на коже, но часто присутствует кальциноз и ишемическая гангрена пальцев кисти. Практически у всех больных с антицентромерными антитела-

ми имеется выраженный синдром Рейно и телангиэктазии.

### Перекрестные синдромы и другие заболевания и состояния, сопровождаемые АНА

Практически у 25% больных с диагнозом системного заболевания клиническая картина не укладывается в классическое описание конкретного заболевания и у них одновременно отмечаются признаки нескольких заболеваний соединительной ткани. Их прототипом является СЗСТ или синдром Шарпа, речь о котором шла при обсуждении иммунологических маркеров СКВ. Этот синдром сочетает признаки всех заболеваний соединительной ткани, и критерии его диагностики основаны на иммунологическом обследовании. Характерно, что если для отбора больных с СЗСТ использовать только клинические критерии заболевания, то наличие или отсутствие антител к U1RNP у этих пациентов не позволяет выделить какую-либо особую группу больных с характерными клиническими признаками.

Нередко перекрестные синдромы отражают временный этап в развитии заболевания, на котором однозначно поставить диагноз невозможно. В этом случае постановка окончательного диагноза требует наблюдения за динамикой клинической картины.

На серологических маркерах нередко базируется описание других перекрестных синдромов, в частности антисинтезного синдрома, склеромиозита и т.д. (табл. 10). Лишь обнаружение у больного сохраняющейся с течением времени совокупности разнородных клинических признаков в сочетании с выявлением иммунологических маркеров одновременно нескольких ревматологических заболеваний заставляет поставить диагноз перекрестного синдрома.

Системные заболевания соединительной ткани, сопровождаемые АНА, представляют собой как бы единое поле, объединяющее специфическую клиническую симптоматику и иммунологические маркеры. Это характерно и для ряда других аутоиммунных заболеваний, в частности, эндокринопатий, при которых часто обнаруживается общность клинической картины и совпадают иммунологические маркеры. Примером могут служить аутоиммунные полигландулярные недостаточности, сочетающие аутоиммунное поражение нескольких желез внутренней секреции и наличие ряда иммунологических маркеров [7].

### Заключение

Подытоживая, можно отметить, что лабораторные иммунологические тесты охватывают весь спектр клинических задач, касающихся вопросов диагностики, терапии и прогноза ревматологических заболеваний. На рис. 1 представлен алгоритм лабораторного обследования ревматологического боль-

Табл. 10. СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ПЕРЕКРЕСТНЫХ СИНДРОМОВ

Клиническая картина	Серологический маркер
СШ/СКВ(/СС/РА) СЗСТ СС/ПМ РА/СКВ/СС Антисинтезазный синдром (ПМ/ДМ/ интерстициальный пневмонит/полиартрит)	Ro/SS-A, La/SS-B U1RNP PM-Scl, Ku PF/дсДНК/Scl-70  Jo-1, другие антисинтезазные антитела

ного при подозрении на системное заболевание соединительной ткани. АНФ используется в качестве основного скринингового метода с последующим применением более специфических лабораторных методов для выявления конкретных типов антиядерных антител. Отрицательный результат иммунофлюоресценции обычно указывает на отсутствие ревматологического заболевания, сопровождаемые АНА, и позволяет исключить основные заболевания соединительной ткани. Однако если клиническая картина прямо указывает на определенное заболевание соединительной ткани, дальнейшее обследование должно основываться на выявлении аутоантител, которые могут быть упущены при анализе иммунофлюоресцентной картины. Возможными разновидностями АНА, которые не выявляются с помощью непрямой иммунофлюоресценции, могут являться антитела к Ro/SSA, Jo-1, дсДНК.

Если при иммунофлюоресценции были обнаружены значительные титры АНА, необходимо дальнейшее лабораторное обследование для обнаружения конкретного типа антител у данного больного. Так, при подозрении на СКВ, дальнейшие исследования должны включать определение антител к дсДНК, Sm, анти-U1RNP, Ro/SSA. Если имеются признаки смешанного заболевания соединительной ткани, синдрома Шогрена, склеродермии, полимиозита, должны быть выполнены серологические тесты по обнаружению антител к U1RNP, Ro/SSA и La/SSB, Scl-70, антицентромерных антител, а также Jo-1.

Необходимо учитывать, что идеального лабораторного теста не существует, и ни одна разновидность АНА не выявляется у 100% больных. В связи с этим целесообразно применять для обследования комплекс методов, позволяющий с большей уверенностью решить диагностическую задачу.

## Список литературы

1. Гусева Н.Г. Системная склеродермия и псевдосклеродермические синдромы – М.: Медицина, 1993. – 268 с.
2. Насонова В.А., Бунчук Н.В. Ревматические болезни – М.: Медицина, 1997. – 520 с.
3. Рытикова Н.С. Диагностика аутоиммунных заболеваний // Лабораторная медицина – 2000. – №2. – С.29-35.

4. Сигидин Я.А., Гусева Н.Г., Иванова М.М. Диффузные болезни соединительной ткани – М.: Медицина, 1994. – 542 с.

5. Alsbaugh M.A., Tan E.M. Antibodies to cellular antigens in Sjogren's syndrome // J. Clin. Invest. – 1975. – Vol.55. – P.1067-1073.

6. Anderson J.R., Gray K.G., Beck J.S., Kinnear W.F. Autoantibodies in Sjogren's syndrome // Lancet – 1961. – P.456-460.

7. Baker J.R. Autoimmune endocrine disease // JAMA. – 1997. – Vol.278. – P.1931-1937.

8. Beck J.S. Variation in the morphological patterns of autoimmune nuclear fluorescence // Lancet – 1961. – P.1203-1205.

9. Ben-Chetrit E. Target antigens of the SSA/Ro and SSB/La system // Am. J. Reprod. Immunol. – 1992. – Vol.28. – P.256-258.

10. Berstain R.M., Steigerwald J.C., Tan E.M. Association of antinuclear and antinucleolar antibodies in progressive systemic sclerosis // Clin. Exp. Immunol. – 1982. – Vol.48. – P.43-51.

11. Bradwell A.R., Stokes R.P., Johnson G.D. Atlas of HEp-2 patterns. Printed by KNP Group Ltd., 1995. – 118 p.

12. Buyon J.P. Neonatal lupus syndromes // Am. J. Reprod. Immunol. – 1992. – Vol.28. – P.259-263.

13. Cabral A.R., Alarcon-Segovia D. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus // Curr. Opin. Rheumatol. – 1998. – Vol.10. – P.409-16.

14. Craft J. Antibodies to snRNP in systemic lupus erythematosus // Rheum. Dis. Clin. North Am. – 1992. – Vol.18. – P.311-335.

15. Dorner T., Trebeljahr G., Goldner B., Yamamoto K., Apostoloff E., Hiepe F. Detection of autoantibodies to Ro(SS-A), La(SS-B) and U1RNP in different congenital heart rhythm disorders using immunoblot and enzyme immunoassay // J. Autoimmun. – 1994. – Vol.7. – P.93-106.

16. Ehrenstein M., Longhurst C., Isenberg D.A. Production and analysis of IgG monoclonal anti-DNA antibodies from systemic lupus erythematosus (SLE) patients // Clin. Exp. Immunol. – 1993. – Vol.92. – P.39-45.

17. Esdaile J.M., Joseph L., Abrahamowicz M., Li Y., Danoff D., Clarke A.E. Routine immunologic tests in systemic lupus erythematosus: is there a need for more studies? // J. Rheumatol. – 1996. – Vol.23. – P.1891-1896.

18. Esdaile J.M., Abrahamowicz M., Joseph L., MacKenzie T., Li Y., Danoff D. Laboratory tests as predictors of disease exacerbations in systemic lupus erythematosus // *Arthritis Rheum.* –1996. –Vol.39. –P.370-378.
19. Felsenfeld G. Chromatin as an essential part of the transcriptional mechanism // *Nature* –1992. –Vol.35. –P.219.
20. Gleicher N., Pratt D., Dudkiewicz A. What do we really know about autoantibody abnormalities and reproductive failure: a critical review // *Autoimmunity* –1993. –Vol.16. –P.115-140.
21. Hardin J.A., Thomas J.O. Antibodies to histones in systemic lupus erythematosus: Localization of prominent autoantigens on histones H1 and H2B // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* –1983. –Vol.1983. –P.7410.
22. Janeway C., Travers P., Walport M., Capra J.D. *Immunobiology: The immune system in health and disease.* 4<sup>th</sup> ed. -Churchill Livingstone, 1999. – 1860 p.
23. Kurata N., Tan E.M. Identification of antibodies to acidic antigens by counterimmunoelectrophoresis // *Arth. Rheum.* –1976. –Vol.23. –P.1026-1035.
24. *Manual of Biological Markers of Disease* // The Netherlands. -Kluwer Academic Publishers, 1995. – 315 p.
25. Mattioli M., Reichlin M. Characterisation of soluble nuclear ribonucleoprotein antigen reactive with SLE sera // *J. Immunol.* –1971. –Vol.107. –P.1281-1286.
26. Merety K., Cebecauer L., Bohm U., Kozakova D., Brozik M. (1989) Study of anti Scl-70 (topoisomerase-1) autoantibodies in rheumatologic patients // *Clin. Rheum.* –1989. –Vol.8. –P.20-36.
27. Merryman P., Louis P. Comparison of assay system for the detecting antibodies to nuclear ribonuclearproteins // *J. Clin. Pathol.* –1991. –Vol.44 –P.685-689.
28. Nakamura R.N., Tan E.M. Approximate ANA frequencies (%) in various systemic diseases: Update on Autoantibodies to Intracellular Antigens in Systemic Rheumatic Diseases // *Clin. Lab. Med.* –1992. –Vol.12. –P.16-32.
29. Nishikai Y., Reichlin H. Heterogeneity of precipitating antibodies in polymyositis and dermatomyositis // *Arth. Rheum.* –1980. –Vol.23. –P.881-888.
30. Northway J.D., Tan E.M. Differentiation of antinuclear antibodies giving speckled staining patterns in immunofluorescence // *Clin. Immunol. Immunopathol.* –1972. –Vol.1. –P.140-154.
31. Olden D.P., Nakamura R.M., Tan E.M. Standardization of the immunofluorescence test for autoantibody to nuclear antigens (ANA): Use of reference sera of defined antibody specificity // *Am J Clin Pathol* –1984. –Vol.82. –P.47-66.
32. Pope R.M., Yoshinoya S., McDuffy S.J. Detection of immune complexes and their relationship to rheumatoid factor in a variety of autoimmune disorders // *Clin. Exp. Immunol.* –1981. –Vol.46. –P.259-267.
33. Rattner J.B., Martin L., Waisman D.M., Johstone S.A., Fritzler M.J. Autoantibodies to the centrosome (centriole) react with determinants present in the glycolytic enzyme enolase // *J. Immunol.* –1991. –Vol.146. –P.:2341-2344.
34. Reeves W.H., Satoh M., Jingson W., Chou C-H., Ajmani A.K. Antibodies to DNA, DNA binding proteins and histones // *Rheum. Dis. Clin. North Am.* –1994. –Vol.20. –P.1-26.
35. Sharp G.C., Irvin W.S., Tan E.M., Gould R.G., Holman H.R. Mixed connective tissue disease – an apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractible nuclear antigen (ENA) // *Am. J. Med.* –1972. –Vol.52. –P.148-159.
36. Tan E.M., Cohen A.S., Fries J.F. et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus // *Arthritis. Rheum.* –1982. –Vol.5 –P.1271.
37. Tan E.M. Antinuclear antibodies: Diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology // *Adv Immunol.* –1989. –Vol.44. –P.93-152.
38. Tan E.M., Kunkel H.G. Characteristics of soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus // *J. Immunol.* –1966. –Vol.96. –P.464.
39. Teh L.S., Bedwell A.E., Isenberg D.A., Gordon C., Emery P., Charles P.J., Harper M., Amos N., Williams B.D. Antibodies to protein P in systemic lupus erythematosus // *Ann. Rheum. Dis.* –1992. –Vol.51. –P.489-494.
40. Ter Borg E.J. Indicators of disease activity and disease patterns in systemic lupus erythematosus. Immunological and serological studies // *PhD Tesis. Groningen* -1990. –89 p.

*поступила в редакцию 15.01.2001  
отправлена на доработку 25.01.2001  
принята к печати 05.02.2001*