DR N. MED. **MAŁGORZATA KLIMCZAK-FILIPPOWICZ**
EUROIMMUN POLSKA

Badania autoprzeciwciał w chorobach wątroby

Autoimmunologiczne choroby wątroby i powiązane autoprzeciwciała

Autoprzeciwciała to immunoglobuliny skierowane przeciwko własnym antygenom organizmu. W zależności od swoistości autoprzeciwciał rozróżnia się autoprzeciwciała organospecyficzne i bez swoistości narządowej, co wiąże się z chorobami autoimmunologicznymi dotyczącymi określonego narządu bądź chorobami układowymi. Autoprzeciwciała są istotne w diagnostyce autoimmunologicznych chorób wątroby, ponieważ występują u większości pacjentów. Stanowią one często **kryterium konieczne do rozpoznania choroby**.

Autoimmunologiczne zapalenie wątroby typu I (dorosłych); *autoimmune hepatitis*; **AIH-1**

- przeciwciała przeciwko mięśniom gładkim (**ASMA**), najważniejszy antygen docelowy – **F-aktyna**
- przeciwciała przeciwjądrowe (**ANA**), najważniejszy antygen dwuniciowy (natywny) DNA (anty-dsDNA, anty-nDNA)
- przeciwciała przeciwko rozpuszczalnemu antygenowi wątrobowemu/antygenowi wątrobowo-trzustkowemu (**anty-SLA/LP**)

Autoimmunologiczne zapalenie wątroby typu 2 (dzieci); *autoimmune hepatitis*; **AIH-2**

- przeciwciała przeciwko mikrosomom nerki i wątroby (**anty-LKM-1**)
- przeciwciała przeciwko cytozolowi hepatocytów typu 1 (**anty-LC-1**)

Pierwotne sklerotyzujące zapalenie dróg żółciowych; *primary sclerosing cholangitis*; **PSC**

- przeciwciała przeciwko cytoplazmie neutrofili (**pANCA**)

Pierwotna żółciowa marskość wątroby; *primary biliary cirrhosis*; **PBC**

- przeciwciała przeciwmitochondrialne (**AMA**)
- przeciwciała ANA o typie *multiple* ***nuclear dots*** (MND): *nuclear body speckeld* 100 kDa (Sp100), *promyelotic leucaemia proteins* (PML), *small ubiquitin-like modifier* (SUMO)
- przeciwciała ANA przeciwko antygenom **błony jądrowej** (*anti-nuclear pore complex*; NPC): glikoproteina 210 kDa (gp210) i nukleoproteina 62 kDa (NUP62)

Metody badania autoprzeciwciał

W 2004 roku powstały rekomendacje dotyczące diagnostyki serologicznej autoimmunologicznych chorób wątroby wydane przez *International Autoimmune Hepatitis Group* (IAHG), które definiują zalecane metody laboratoryjne. Zgodnie z tymi rekomendacjami **immunofluorescencja pośrednia** (*indirect immunofluorescence test*; IIFT) z wykorzystaniem tkanek kilku organów gryzoni (zwykle szczurów) jako źródła antygenów powinna stanowić skryning. Rekomendacje definiują również inne metody jako uzupełnienie diagnostyki.

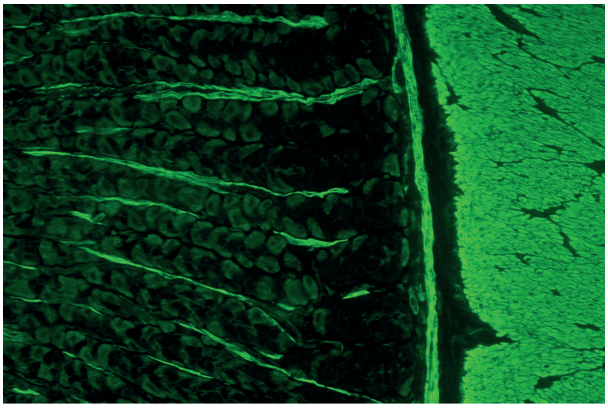
Przeciwciała przeciwko mięśniom gładkim ASMA (*anti-smooth muscle antibodies*)

Reagują one z antygenami struktur mięśniowych. Standardowym substratem do oceny ASMA metodą IIFT są mrożone skrawki żołądka szczura – z uwagi na prostotę oceny wynikającą z szerokiej warstwy mięśni gładkich w ścianie żołądka. Potwierdzenie obecności przeciwciał ASMA o typie aktynowym uzyskuje się w teście IIFT przy użyciu komórek HEp-2, gdzie obserwowana jest charakterystyczna reakcja cytoszkieletu komórki.

Wysokie (powyżej 1:1000) i stale utrzymujące się miano przeciwciał **ASMA o typie aktynowym wskazuje na autoimmunologiczne zapalenie wątroby typu 1 (AIH-1)**. Stanowią one jedno z kryteriów rozpoznania AIH-1. Są obecne u **87% pacjentów z AIH**, często jako jedyny marker (33%) lub wraz z ANA (54%).

Niskie miana ASMA występują w wirusowych oraz polekowych zapaleniach wątroby, poalkoholowej marskości wątroby, niedrożności dróg żółciowych, a także w przebiegu tocznia trzewnego i u około 2% osób bez objawów chorobowych, dlatego w wątpliwych przypadkach warto powtórzyć badanie po 2–3 miesiącach.

Ze względu na trudność wyizolowania specyficznego dla AIH antygenu (F-aktyny) z zachowaniem jego właściwości antygenowych nie istnieją testy potwierdzające obecność ASMA oparte na metodach immunoenzymatycznych.



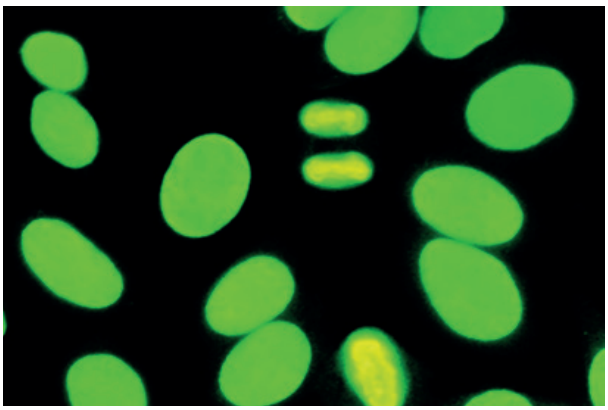
1. Żołądek szczura. ASMA

Metoda badania	Zalety	Wady
Immunofluorescencja pośrednia (**IIFT**) służy do badania wielu **podstawowych autoprzeciwciał**. Na wyniku badania znajduje się **nazwa autoprzeciwciał** oraz ich **miano**. Czasami wynik jest opisowy, wskazujący na struktury histologiczne zaangażowane w reakcję. Miano przeciwciał to największe rozcieńczenie próbki, przy którym nadal jeszcze można rozpoznać specyficzny typ fluorescencji.	1. niski koszt odczynnika 2. możliwość jednoczesnego wykrywania lub wykluczania obecności wielu autoprzeciwciał podczas jednej inkubacji 3. jedyna metoda wykrycia ASMA 4. wykrywanie autoprzeciwciał nietypowych, o nieznanych specyficznościach (badania naukowe) Idealny test do **skryningu**.	1. Obraz oceniany jest subiektywnie przez diagnostę, dlatego jakość wyników testu w dużej mierze zależy od umiejętności i doświadczenia personelu. 2. Metoda manualna. Automatyzacja ma sens jedynie przy bardzo wysokiej liczbie badań.
Testy ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) służą do ilościowego lub półilościowego oznaczania *in vitro* autoprzeciwciał przeciwko **jednemu określonemu antygenowi** w surowicy lub plazmie krwi.	1. prostota wykonania (zautomatyzowanie) 2. obiektywny odczyt fotometryczny 3. wyniki ilościowe Idealny test do **dużych serii badań** i **do potwierdzania** obecności danych autoprzeciwciał.	1. dość wysoki koszt 2. możliwość oceny tylko jednego typu autoprzeciwciał w jednym badaniu 3. brak możliwości badania niektórych istotnych przeciwciał (ASMA) **Nie są zalecane do skryningu.**
Testy Immunoblot służą do półilościowego badania całego profilu autoprzeciwciał przeciwko **kilku/kilkunastu określonym antygenom**.	1. prostota wykonania (zautomatyzowanie) 2. łatwy, obiektywny odczyt (skaner) 3. możliwość jednoczesnego badania kilku bądź kilkunastu autoprzeciwciał 4. do pojedynczych surowic bez strat na odczynnikach 5. wyniki półilościowe Idealne do **małych serii badań**, do **jednoczesnego różnicowania i potwierdzania wielu autoprzeciwciał**.	1.brak możliwości oceny niektórych istotnych przeciwciał (ASMA) **Nie są polecane do skryningu.**

Przeciwciała przeciwjądrowe (*anti-nuclear antibodies*; ANA)

Standardową techniką w diagnostyce ANA jest immunofluorescencja pośrednia z komórkami HEp-2. Są to ludzkie komórki nabłonkowe raka krtani (*Human larynx Epithelioma cancer type-2 cell line*). Ze względu na ogromne jądro komórkowe i wiele komórek w fazie podziału można z dużą dokładnością zdefiniować strukturę komórki i jądra, z którą związały się autoprzeciwciała. Metoda ta charakteryzuje się dużą specyficznością – można dokładnie ocenić mikroskopowo rozłożenie fluoresceiny w jądrze oraz cytoplazmie i tym samym bliżej określić antygeny docelowe dla przeciwciał. Każde z autoprzeciwciał ma określony typ fluorescencji, zależny od lokalizacji poszczególnych antygenów.

W AIH najczęściej występuje typ świecenia homogenny (antygen związany z chromatyną, dsDNA), poza tym typ ziarnisty i jąderkowy. W PBC obserwuje się typ *multiple nuclear dots* (MND) i typ „błona jądrowa" (*nuclear pore complex*; NPC). Izolowane **ANA występują u około 15% pacjentów z autoimmunologicznym zapaleniem wątroby (AIH-1), częściej towarzyszą ASMA**.



2. HEp-2. ANA homogenny

Niskie i zmienne miana ANA występują w wielu chorobach autoimmunologicznych, a także u osób starszych i osób bez objawów chorobowych.

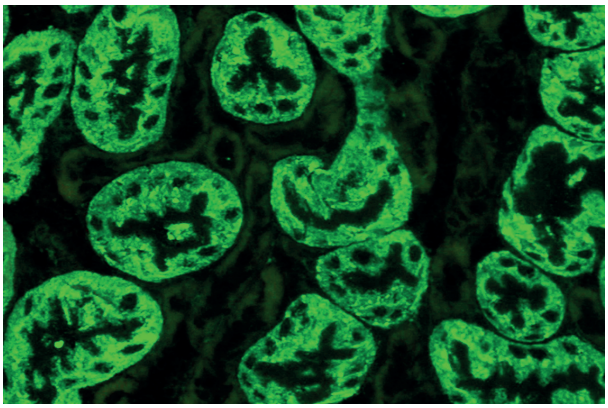
Przeciwciała przeciwko rozpuszczalnemu antygenowi wątrobowemu lub antygenowi wątrobowo-trzustkowemu (*anti-soluble liver antigen/liver-pancreas antigen*; anty-SLA/LP)

Białko SLA/LP występuje w cytoplazmie i najprawdopodobniej ma swój udział w regulacji biosyntezy białek (białko związane z supresorem UGA-tRNA). Przeciwciała anty-SLA/LP do niedawna można było badać wyłącznie metodami immunoenzymatycznymi (testy ELISA, Immunoblot), gdzie antygenem jest rekombinowane białko SLA/LP. Obecnie dostępne są również testy IIFT z komórkami transfekowanymi plazmidem kodującym to białko.

Wartość diagnostyczna anty-SLA/LP jest bliska 100% – każdy dodatni wynik jednoznacznie wskazuje na autoimmunologiczne zapalenie wątroby typu 1 (AIH-1), o ile występują odpowiednie objawy kliniczne. W przeciwieństwie do pozostałych autoprzeciwciał, przeciwciała anty-SLA/LP są wysoce specyficzne dla AIH i nie były opisywane w przebiegu innych chorób. Anty-SLA/LP mogą występować w AIH-1 wraz z innymi autoprzeciwciałami lub jako jedyny marker. Ich prewalencja wynosi 30%, są markerem ciężkiego przebiegu choroby.

Przeciwciała przeciwko mikrosomom nerki i wątroby (*anti-liver kidney microsomes*; anty-LKM-1)

Przeciwciała anty-LKM bada się metodą IIFT na mrożonych skrawkach tkanek szczura (wątroba i nerka). Na nerce szczura widoczna jest drobnoziarnista fluorescencja kanalików proksymalnych w obszarze kory. Kanaliki dystalne są negatywne. Jednolicie barwią cytoplazmę hepatocytów szczura. Przeciwciała przeciwko antygenowi LKM-1 można również badać metodami immunoenzymatycznymi (testy ELISA, Immunoblot), gdzie antygenem jest rekombinowany cytochrom P450 IID6. **Anty-LKM-1 są uznawane za rzadki, jednak istotny marker autoimmunologicznego zapalenia wątroby typu 2 (AIH-2).** Wykrywa się je tylko u około 1% dorosłych pacjentów z AIH, a u dzieci są częstsze. Ich występowanie nawet w niskich mianach u dzieci powinno skłaniać do poszerzonej diagnostyki i obserwacji.



3. Nerka szczura. LKM

Obecność przeciwciał anty-LKM obserwuje się również w trakcie wirusowego zapalenia wątroby typu C lub D, w polekowych zapaleniach wątroby, w zapaleniu wątroby w przebiegu wielonarządowego zespołu endokrynologicznego typu 1.

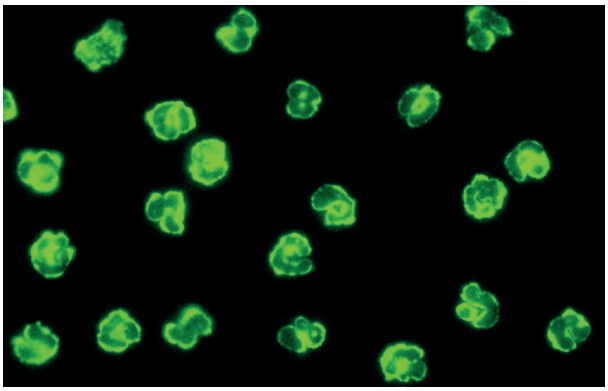
Przeciwciała przeciwko cytozolowi hepatocytów typu 1 (*anti-liver cytosolic antigen 1*; anty-LC-1)

Mogą być wykrywane metodą immunofluorescencji, jednakże z uwagi na towarzyszące im często anty-LKM-1, które reagują w tych samych obszarach tkanki wątroby szczura, łatwo je przeoczyć. Antygenem docelowym jest formiminotransferaza cyklodeaminazy (FTCD) i to białko rekombinowane jest antygenem w metodzie ELISA i Blot. Testy te dają jednoznaczne wyniki.

Przeciwciała te występują w autoimmunologicznym zapaleniu wątroby typu 2 (AIH-2) wraz z LKM-1 bądź jako jedyny marker.

Przeciwciała przeciwko cytoplazmie neutrofili o typie świecenia perinuklearnym (*perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibody*; pANCA)

Występują w zapaleniach naczyń, przewlekłych zapalnych chorobach jelit oraz chorobach wątroby. Przeciwciała pANCA bada się na utrwalonych etanolem ludzkich granulocytach od dawców krwi grupy 0. Gładka fluorescencja otaczająca wstążkowato jądro granulocytu (**pANCA** – typ perinuklearny; mniej lub bardziej rozproszony) może być wywoływana przez przeciwciała o różnej swoistości.



5. Granulocuty. pANCA

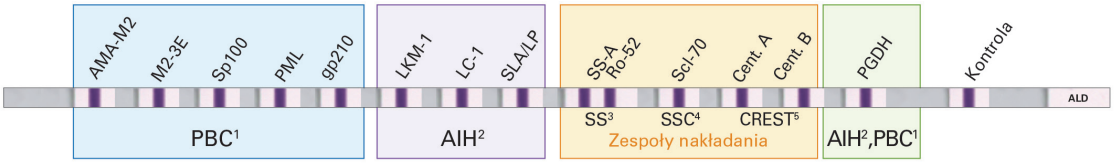
W chorobach wątroby **pANCA wykrywa się u większości (85%) pacjentów z pierwotnym sklerotyzującym zapaleniem dróg żółciowych (PSC)**. Poza tym pANCA mogą się pojawiać w AIH – wskazują wówczas na ciężki przebieg choroby.

Przeciwciała przeciwko mitochondriom (*anti-mitochondrial antibody*; AMA)

Przeciwciała AMA są rutynowo badane za pomocą testu IIFT. Standardowym substratem są **skrawki nerki szczura**. Cytoplazma komórek proksymalnych i dystalnych kanalików nerkowych wykazuje ziarnistą fluorescencję nasiloną w części podstawnej. Potwierdzenie występowania AMA odbywa się za pomocą testów ELISA i Blot.

Antygenem w testach immunoenzymatycznych może być natywny antygen AMA-M2 (dehydrogenaza pirogronianowa) bądź bardziej czułe białko rekombinanowane. Trzy domeny **enzymów kompleksu dehydrogenazy wewnętrznej błony mitochondrium**: dehydrogenazy rozgałęzionych α-ketokwasów (**B**COADH-

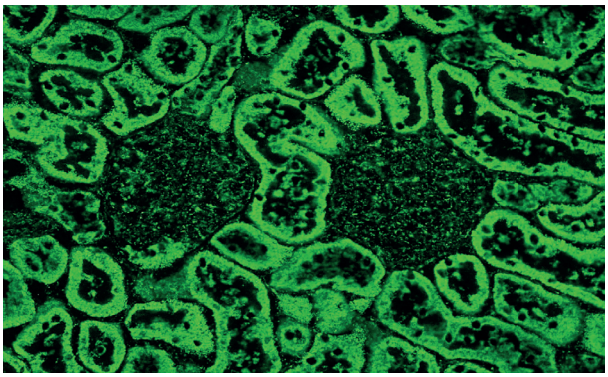
EUROLINE Profil Autoimmunologiczne choroby wątroby (14 antygenów)



[1] Pierwotna żółciowa marskość wątroby; [2] Autoimmunologiczne zapalenie wątroby; [3] Zespół Sjögrena; [4] Twardzina układowa; [5] Ograniczona postać twardziny

4. EUROLINE Liver Profile

TEKST PROMOCYJNY



6. Nerka szczura. AMA

-E2), dehydrogenazy pirogronianowej (**P**DH-E2) i dehydrogenazy α-ketoglutaranu (**O**GDH) można połączyć metodami inżynierii genetycznej w rekombinowane białko **BPO-3E**, które zawiera wszystkie znaczące epitopy. Skonstruowane białko fuzyjne zwiększa czułość testu w porównaniu z systemem bazującym wyłącznie na natywnym antygenie M2.

Przeciwciała przeciwko AMA-M2 są specyficznym i czułym markerem diagnostycznym pierwotnej żółciowej marskości wątroby (PBC) i stwierdza się je u 94% pacjentów. Wysokie miano przeciwciał anty-AMA-M2 jest szczególnie istotne w diagnostyce tej choroby i stanowi narzędzie prognozujące późniejszy rozwój schorzenia u pacjentów bez znaczących zaburzeń funkcji wątroby sugerujących chorobę cholestatyczną. Przeciwciała przeciwko AMA-M2 można wykryć również w innych chorobach nakładających się na PBC: w AIH oraz w zaburzeniach immunopatologicznych niewpływających pierwotnie na wątrobę, takich jak skleroderma (6% pacjentów) i zespół Sjögrena. Przeciwciała AMA wykrywa się rzadko w przewlekłych wirusowych zapaleniach wątroby oraz chorobach układowych tkanki łącznej, takich jak toczeń trzewny. Zasadniczo w innych chorobach, poza PBC, AMA występuje w niskich mianach.

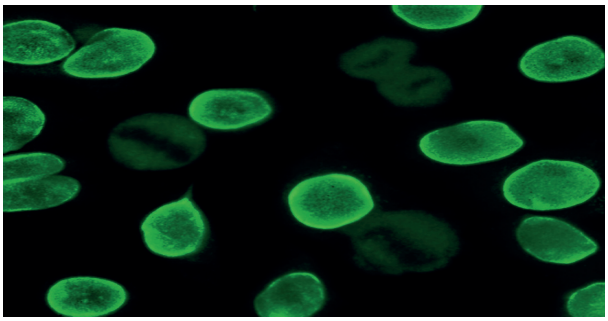
Przeciwciała ANA o typie świecenia *multiple nuclear dots* i „błona jądrowa"

Do tej pory wyodrębniono dwa typy świeceń ANA powiązane z autoimmunologicznymi chorobami wątroby: *nuclear dots* oraz typ świecenia błony jądrowej.

Za typ świecenia *multiple* ***nuclear dots*** (MND) odpowiadają przeciwciała przeciw:

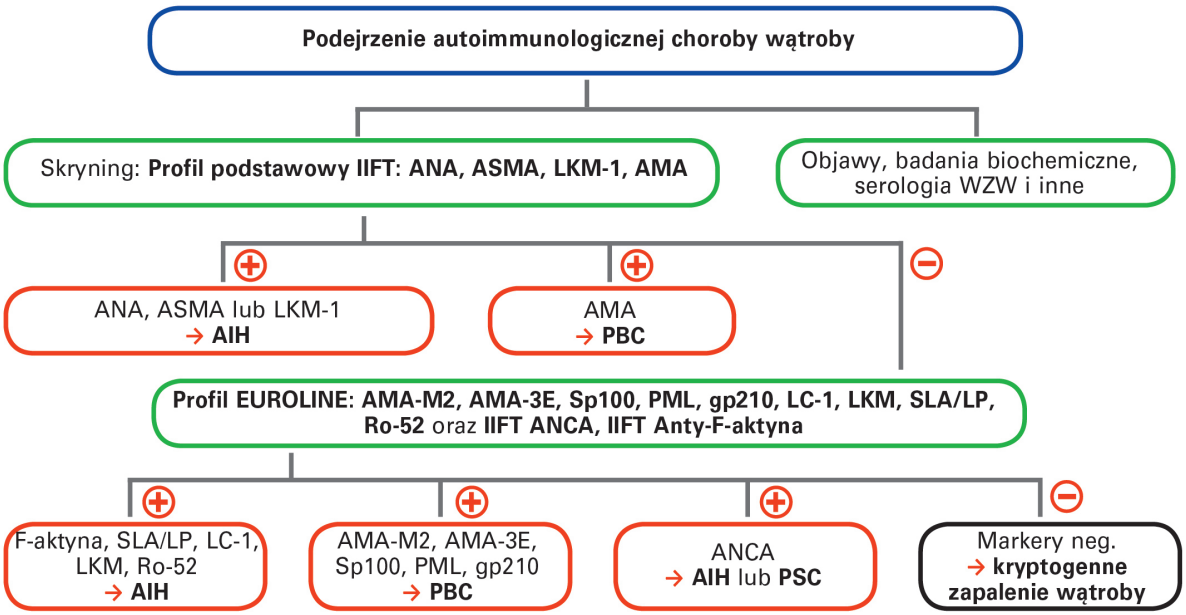
- białka białaczki promielocytowej (*promyelotic leucaemia proteins*; PML),
- *small ubiquitin-like modifier* (SUMO),
- *nuclear body speckeld* 100 kDa (Sp100).

Za typ **świecenia „błona jądrowa"** (*anti-nuclear pore complex*; NPC) odpowiadają przeciwciała przeciw:



7. HEp-2. ANA „błona jądrowa"

Diagnostyka autoimmunizacyjnych chorób wątroby



Na podstawie: Diagnosis and management of autoimmune hepatitis (2010). HEPATOLOGY, Vol. 51, No. 6, 2010

8. Algorytm postępowania w wykrywaniu autoprzeciwciał w chorobach wątroby

TEKST PROMOCYJNY

- glikoproteina 210 kDa (gp210),
- nukleoproteina 62 kDa (NUP62).

ANA o typie świecenia *nuclear dots* i „błona jądrowa" (*nuclear pore complex*) wykrywane są metodą IIFT z komórkami HEp-2. Poza tym istnieją testy potwierdzające Blot, w których zastosowano odpowiednie białka rekombinowane. Wszystkie wymienione powyżej typy przeciwciał ANA występują **w pierwotnej żółciowej marskości wątroby (PBC)**. Odgrywają one rolę w diagnostyce rzadkich przypadków PBC przebiegających bez przeciwciał AMA (około 5% pacjentów).

Przeciwciała przeciwko D-3-fosfoglicerynianowej dehydrogenazie (*D-3-phosphoglycerate dehydrogenase*; 3-PGDH)

Niedawno odkryto kolejne autoprzeciwciała skierowane przeciwko PGDH. Występują one u 31% pacjentów z **autoimmunologicznym zapaleniem wątroby** oraz u 9% pacjentów z **pierwotną żółciową marskością wątroby**. Nie wykrywano ich u osób zdrowych i z infekcją HBV.

Interpretacja badań autoprzeciwciał

Niektóre autoprzeciwciała, szczególnie w wysokich mianach, występują przede wszystkim w autoimmunologicznych chorobach wątroby (np. LKM, LC-1, SLA/LP, AMA, ASMA). Jednak nie wszystkie – część z nich pojawia się również w innych schorzeniach o podłożu autoimmunizacyjnym (np. ANA, pANCA). Ich produkcja zmienia się w czasie trwania choroby, dlatego **wyniki badania autoprzeciwciał należy interpretować zawsze w odniesieniu do innych badań i objawów klinicznych**.

Algorytm postępowania w wykrywaniu autoprzeciwciał w chorobach wątroby

Badanie autoprzeciwciał istotnych w autoimmunologicznych chorobach wątroby powinno być wykonane w przypadkach występowania objawów klinicznych lub nieprawidłowych wyników badań laboratoryjnych wskazujących na chorobę autoimmunologiczną (np. podwyższone aktywności aminotransferaz, zwiększone stężenie gammaglobulin lub całkowitego IgG bądź IgM). W diagnostyce autoimmunologicznych chorób wątroby w pierwszym rzędzie stosuje się testy skryningowe. Zgodnie z rekomendacjami *International Autoimmune Hepatitis Group* należy **jednocześnie badać cały panel podstawowych autoprzeciwciał, tzn.: ANA, ASMA, LKM-1, AMA, metodą IIFT, przy użyciu kilku substratów tkankowych**. Te podstawowe badania pozwalają na zidentyfikowanie większości pacjentów z autoimmunologiczną chorobą wątroby. W przypadku wyników negatywnych podstawowych autoprzeciwciał należy posłużyć się **testami do badania rzadziej występujących autoprzeciwciał: SLA/LP, LC-1, pANCA** lub oceniać przeciwciała bardziej specyficzne: **anty-F-aktynę, anty-PDH-E2** (kompleks dehydrogenazy pirogronianowej) i inne.

Przygotowano na podstawie: M. Klimczak, *Diagnostyka immunologiczna chorób wątroby*, [w:] *Diagnostyka chorób wątroby*, pod red. K. Simona, Poznań 2012, s. 83–102.

Autoimmunologiczne choroby wątroby

Dwuetapowa diagnostyka zgodna z rekomendacjami

I. Basic Profil IIFT

- ANA
- LKM-1
- ASMA
- AMA

II. Profil Liver EUROLINE

- AMA-M2
- PML
- LKM
- AMA-3E
- gp210
- SLA/LP
- Sp100
- LC-1
- Ro-52