

Autoprotilátky v diagnostice autoimunitních onemocnění jater

Autoantibodies in autoimmune liver diseases diagnosis

Doporučení SLI ČSAKI schválené výborem ČSAKI.

IVO LOCHMAN

Odbor imunologie a alergologie ZÚ se sídlem v Ostravě

SOUHRN

Článek přináší stručný přehled současných možností v diagnostice a monitorování autoimunitních onemocnění jater pomocí autoprotilátek. Cílem práce je pomoci pracovníkům využívajícím detekci a stanovení autoprotilátek k diagnostice, monitorování aktivity a úspěšnosti léčby těchto onemocnění.

Klíčová slova: autoimunitní onemocnění jater, autoprotilátky, diagnostika

SUMMARY

Current possibilities in diagnosis and monitoring of autoimmune liver diseases using autoantibodies are shortly reviewed in this article. The aim of this study is to help specialists engaged in autoantibody detection and determinations for better diagnose setting, disease activity monitoring and successful treatment of these diseases.

Key words: autoimmune liver diseases, autoantibodies, diagnosis

Podobně jako většina autoimunitních onemocnění jsou i autoimunitní onemocnění jater (Autoimmune liver diseases - AILD) provázena tvorbou zvýšeného množství protilátek proti určitým strukturám tkání a buněk. Detekce, popř. stanovení koncentrací těchto protilátek, pak pomáhají v diagnostice a monitorování aktivity příslušných onemocnění. I AILD se často nevyskytují samostatně a jsou u vnímavých jedinců provázena jinými autoimunitními onemocněními postihujícími jak játra (překryvné syndromy – overlap syndromes), tak ostatní orgány. Většina autoprotilátek využívaných v diagnostice AILD není pro dané onemocnění specifická, i když bývají pro tato onemocnění vysoce citlivá (nacházejí se u vysokého procenta postižených jedinců). Přehled AILD a nejběžnějších autoprotilátek s nimi asociovaných přináší tab. 1.

Racionální provádění diferenciální diagnostiky AILD pomocí autoprotilátek by mělo začínat některým ze screeningových multiplexových vyšetření, které dokáže odhalit několik typů autoprotilátek. Tato vyšetření jsou založena na technikách nepřímé imunofluorescence (IIF) využívajících kombinací několika substrátů nebo blotovacích

technikách (westernblot nebo lépe line/dot techniky). V poslední době začínají být dostupné také další postupy, jako je např. ALBIA (addressable laser bead immunoassays). Na základě výsledků těchto screeningových vyšetření pak může další typizace protilátek pokračovat v případě potřeby specializovanějšími cílenými vyšetřeními. Bohužel, žádná ze screeningových technik nedokáže spolehlivě určit všechny autoprotilátky vyskytující se u AILD (viz tab. 2).

Byla vypracována řada schémat, jak postupovat a interpretovat výsledky takovýchto screeningových vyšetření. Nejčastější kombinací substrátů u IIF techniky při diagnostice AILD je kombinace krysích nebo myších jater, ledvin a žaludku. Tato kombinace dovoluje určit řadu protilátek, podle jejichž přítomnosti pak lze usuzovat na konkrétní AILD (viz obr. 1). Je si však nutno uvědomit, že při použití zejména krysích substrátů budeme nalézat také řadu tzv. heterofilních protilátek na jednotlivých substrátech, které komplikují interpretaci nálezu a které jsou namířeny proti nejrůznějším strukturám použitých tkání (retikulin, struktury buněčného jádra, Kupfferovy

Tab. 1: Autoprotilátky u autoimunitních onemocnění jater

onemocnění	ANA	SMA	ANCA*	anti-LKM	anti-SLA/LP	anti-LC-1	anti-ASGPR	AMA
AIH1	+	+	+/-		+/-		+	
AIH2			+/-	+		+	+	
AIH3**			+/-		+		+	
PBC	+						+	+
PSC			+					
overlap sy	+	+/-			+		+	+
APECED sy				+			+	

ANA – protilátky proti jaderným strukturám buněk (Anti-Nuclear Antibodies), SMA – protilátky proti hladkým svalům (Smooth Muscle Antibodies), ANCA – protilátky proti cytoplasmě neutrofilů (Anti-Neutrophil Cytoplasmatic Antibodies), LKM – mikrosomy jater a ledvin (Liver-Kidney Microsomes), SLA – rozpustný jaterní antigen (Soluble Liver Antigen), LP – antigen jater a slinivky (Liver/Pancreas) – je totožný s SLA, LC-1 – antigen jaterního cytosolu typu 1 (Liver Cytosolic – 1), ASGPR – asialoglykoproteinový receptor (ASialoGlycoProtein Receptpor), AMA – protilátky proti mitochondriím (Anti-Mitochondrial Antibodies), AIH – autoimunitní hepatitida (Autoimmune Hepatitis), PBC – primární biliární cirhóza (Primary Biliary Cirrhosis), PSC – progresivní sklerotizující cholangitida (Progressive Sclerosing Cholangitis), APECD/APS-1 – autoimunitní polyendokrinnopatický- kandidózo-ektodermální dystrofický syndrom/autoimunitní polyglandulární syndrom typu 1.

* V naprosté většině případů nejde o ANCA, ale o ANA proti laminám jader myeloidních buněk, které připomínají svým fluorescenčním obrazem na etanolem fixovaných lidských granulocytech P-ANCA [18-20].

** Dnes není již často vyčleňována AIH3 jako zvláštní kategorie a bývá zařazována pod AIH1, poněvadž se chová klinicky stejně. I u AIH1 bývají některými autory nalézány protilátky proti SLA/LP.

Zpracováno podle (1-24).

Tab. 2: Techniky používané v diagnostice autoprotilátek u autoimunitních onemocnění jater

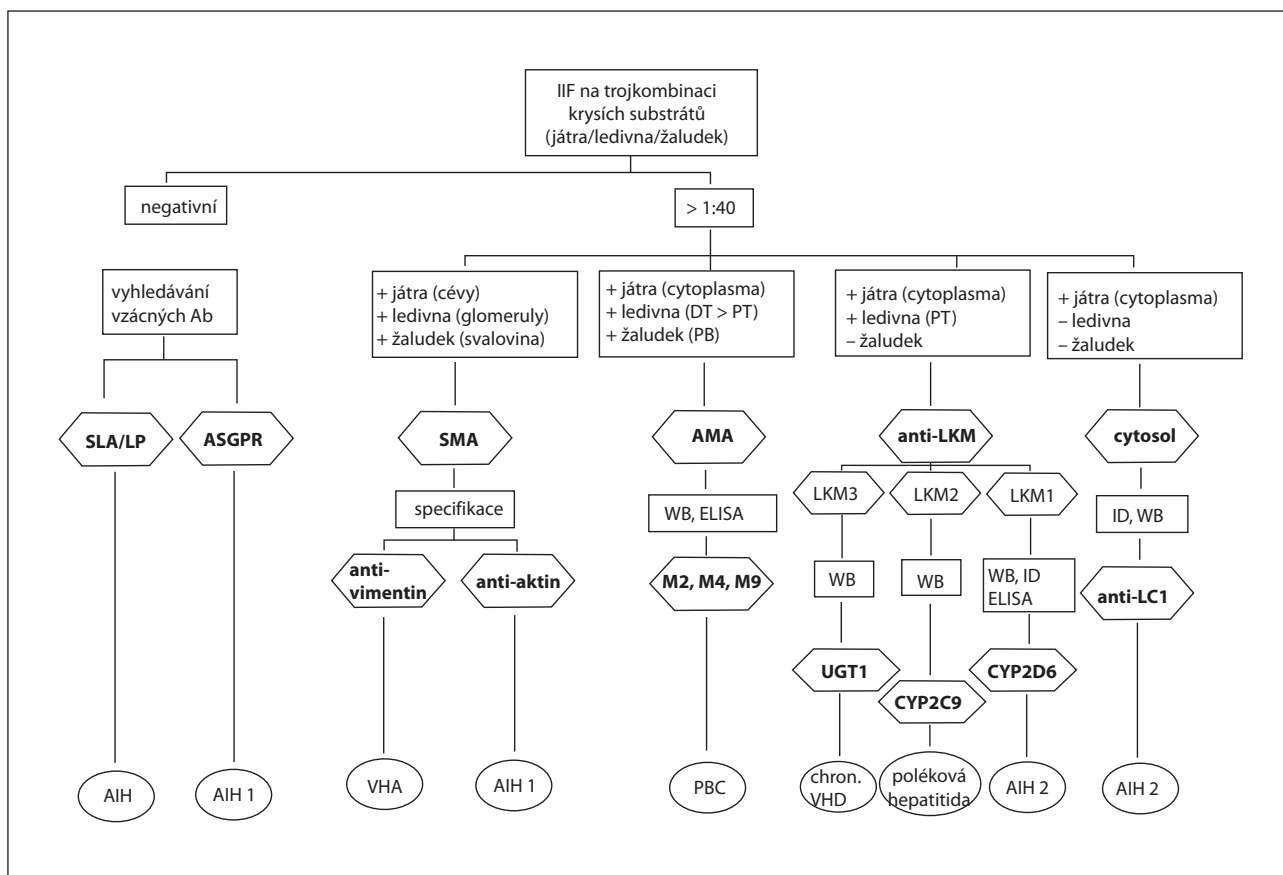
	IIF					ID	ELISA	WB
	játra	ledvina	žaludek	HEp-2	granul.			
F-aktin (SM)	+	+	+	+		(+)	+	+
LKM	+	+				+	+	+
LC1	+					+	+	+
mitochondrie	+	+	+	+			+	+
jaderné Ag	+	+	+	+	+	+	+	+
jaderné Ag granulocytů					+			+
LSP/LMA	+							
SLA/LP							+	+
ASGPR							+	

upraveno podle [3]. LSP – anti-liver-specific membrane lipoprotein, LMA – liver membrane antigen, IIF – nepřímá imunofluorescence, ID – imunodifúze, WB – westernblot

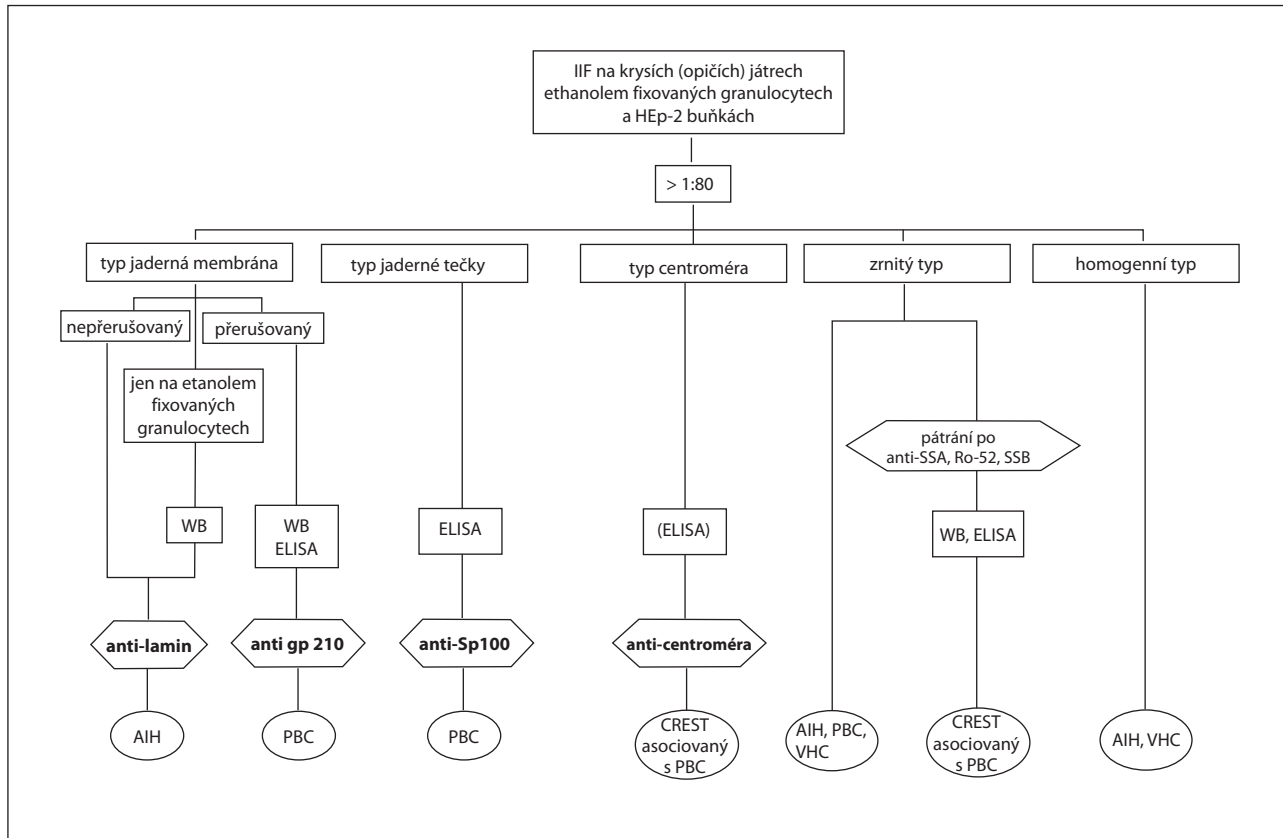
buňky aj). Používají-li se místo hlodavčích tkání tkáně opičí, mohou komplikovat interpretaci výsledků protilátky proti AB skupinovým krevním antigenům, které jsou u opic identické s lidskými a jsou exprimovány na endoteliích a kapilárách větších cév ve většině tkání (3). Kvalita konjugátu je proto u IIF jedním z kritických kroků. V diagnostice AMA a anti-LKM je zapotřebí, použila-li se jako substrát jen ledvina, rozlišovat mezi proximálními a distálními tubuly. To však u většiny komerčních preparátů není možné. I v případě, že by každý řez obsahoval také medulu potřebnou pro toto rozlišení, vyžadovalo by to velkou zkušenost hodnotitele. Proto je v praxi při aplikaci výše zmíněné trojkombinace substrátů využívána k rozlišení AMA a anti-LKM protilátek skutečnost, že většina AMA protilátek, zejména AMA-M2 barví téměř

všechny tubuly v preparátu ledviny a zároveň cytoplasmu parietálních buněk žaludku, zatímco anti-LKM protilátky jen některé tubuly na ledvině a parietální buňky žaludku jsou negativní. Na játrech je jak AMA, tak anti-LKM protilátkami barvena cytoplasmata hepatocytů, kdy AMA protilátky poskytují hrubší zrnitou fluorescenci, anti-LKM protilátky jemnější, závojitou. To lze ale v praxi jen těžko rozlišit, nebudeme-li mít preparát s AMA a anti-LKM protilátkami vedle sebe. Stejně tak je obtížné pomocí IIF rozlišit anti-LC1 a anti-LSA/LP protilátky, kdy anti-LC1 protilátky poskytují na játrech sníženou intenzitu fluorescence v okolí centrilobulární oblasti, zatímco anti-SLA/LP zvýšenou (9).

I když se říká, že většina autoprotilátek je druhově a řada i orgánově nespecifická, není tomu zcela tak. A tak



Obr. 1: Schéma diagnostiky autoimunitních onemocnění jater pomocí autoprotilátek. Upraveno podle (2).



Obr. 2: Diagnostika základních typů ANA asociovaných a autoimunitními onemocněními jater.

Upraveno podle (2). Nepřerušovaný typ jaderné membránové fluorescence odpovídá obrazu „homogenní jaderná membrána“ (smooth membraneous nuclear pattern) a přerušovaný typ „póry v jaderné membráně“ (punctate membraneous nuclear pattern) podle (23). Rovněž anti-SSA a anti-Ro-52 protilátky nemusejí vždy na HEp-2 buňkách vykazovat zrnitý typ jaderné fluorescence.

použití opičích jater bývá preferováno pro diagnostiku anti-LSP (anti-liver-specific membrane lipoprotein) a anti-LMA (anti-liver membrane antigen) protilátek před substráty hlodavců (krysa, myš). Tyto protilátky však již dnes nejsou v diagnostické praxi příliš využívány a nebyly nikdy zcela charakterizovány (21). Z protilátek proti membránovým jaterním antigenům se tak dnes využívají v diagnostice, ale především v monitorování aktivity onemocnění jen protilátky proti asialoglykoproteinovým receptorům (ASGPR), které nejsou pro AILD specifické (vyskytují se např. i u řady virových hepatitid), dobře však korelují s aktivitou onemocnění (21,5). Intenzita barvení cytoplasmu hepatocytů u AMA a anti-LKM protilátek bývá u opičích jater nižší než u hlodavčích.

Pro typizaci a přesnější určení ANA u AILD je zapotřebí provést IIF analýzu většinou také na HEP-2 buňkách. Ne všechny antigeny důležité pro dg AILD jsou běžně zastoupeny v blotovacích technikách a v ELISA, především v těch, které jsou zaměřeny na diagnostiku degenerativních onemocnění pojiva (obr. 2). Velmi důležitý pro výsledný fluorescenční obraz na HEP-2 buňkách je kultivace a příprava těchto buněk. Proto stejné protilátky mohou dávat na HEP-2 buňkách různých výrobců i dosti

rozdílné obrazy. Platí to zejména o SMA, anti-SSA (Ro60) a anti-Ro52 protilátkách. Špatná fixace substrátů může také výrazně ovlivnit jejich citlivost pro určité protilátky (platí také zejména pro SMA).

V imunoanalytických technikách (ELISA, WB, line/dot imunoblot, ALBIA) jsou většinou používány dobře definované, často rekombinantní antigeny. Přesto se mohou výsledky získané soupravami různých výrobců lišit. U screeningových ANA a ENA ELISA je zapotřebí vždy vědět, zda jako antigen byl použit nějakým způsobem definovaný extrakt, nejčastěji HEP-2 buněk, nebo směs definovaných antigenů a v tom případě, kterých. Je si zapotřebí uvědomit, že při navazování antigenů na povrch imunosorbentu, zvláště jsou-li používány komplexní antigeny nebo směsi, může dojít ke ztrátě některých důležitých epitopů nebo naopak mohou být vytvořeny některé epitopy nové. Je proto vždy nutné vědět a uvádět s jakou diagnostickou soupravou bylo vyšetření prováděno a pro které antigenní specifity můžeme nebo nemůžeme očekávat pozitivní nález, pokud jsou ve vyšetřovaném vzorku přítomny hledané protilátky. Tak např. AMA protilátky představují velký komplex protilátek, z nichž s PBC jsou asociovány především AMA M2,

Tab. 3: Imunofluorescenční charakteristika anti-LKM, AMA a dalších protilátek na trojkombinaci krysích substrátů. Upraveno podle (14–16) a další citované literatury.

protilátka	játra	ledvina	žaludek
LKM-1	stejná reakce se všemi hepatocyty	PT3>PT2>PT1	-
LKM-C	stejně jako LKM-1, nižší titry		
LKM-2	převládají centrilobulární hepatocyty (CLH)	PT1, PT2>PT3	
LKM-3	jako LKM-1	PT2>PT1, PT3	
LH, halothan	2 nebo 3 vrstvy CLH	-	-
LM, anti-convulsiva	2 vrstvy CLH	-	-
LM, dihydralazin	1 vrstva CLH	-	-
AMA-M2	+	DT > PT	granulární fluorescence PB
AMA-M3	+	DT > PT	hlavní („chief“) buňky
AMA-M5	+	PT > DT	mucinózní buňky krčku
AMA-M6	+	DT	APUD (enteroendokrinní) buňky
LC-1	podobně jako LKM-1	-	-
ANA	+	+	+
SMA	+	+	+
retikulín 1 & 2	+	+	+
retikulín Rs:R3:R4	+	-	-
parietální buňky (PB)	-	-	+
GBM	-	+	-
TBM	-	+	-
neuronální	-	-	+
heterofilní krysí	+	+	+
heterofilní myší	-	-	+

PT – proximální tubuly 1., 2. a 3. řádu, DT - distální tubuly, PB - parietální (krycí, oxyntické) buňky, LC-1 – jaterní cytosolový antigen typu 1, GBM – basální membrána glomerulů, TBM – basální membrána tubulů, SMA protilátky proti hladkému svalstvu, ANA – antinukleární protilátky, LM – mitochondrie jater (liver mitochondria).

M4, M8 a M9 (16), (tab.3). Jsou namířeny proti různým podjednotkám komplexu dehydrogenáz 2-oxo-kyselin. Ne všichni pacienti s PBC musí reagovat se všemi podjednotkami tohoto komplexu. Proto i u ELISA a blotových souprav pro diagnostiku AMA je nutné vědět, jaké antigeny byly v soupravách použity (11).

Závěr

Tento přehled byl vypracován, aby usnadnil pracovníkům provádějící diagnostiku autoimunitních onemocnění jater pomocí autoprotilátek orientaci při výběru postupů a technik v této oblasti a při interpretaci nalezených výsledků. Je si zapotřebí uvědomit, že výskyt zvýšených koncentrací určitých autoprotilátek je jen jedním z kritérií, které pomáhají diagnostikovat autoimunitní onemocnění, popř. monitorovat jeho aktivitu či úspěšnost léčby. Obecně se dá říci, že diagnostika těchto autoprotilátek zvyšuje pravděpodobnost stanovení správné diagnózy a aktivity onemocnění s větší nebo menší mírou.

RNDr. Ivo Lochman, CSc.

Odbor imunologie a alergologie ZÚ se sídlem v Ostravě
Partyzánské náměstí 7
e-mail: ivo.lochman@zuova.cz

LITERATURA

- Berg PA, Klein R. Heterogeneity of antimitochondrial antibodies. *Semin Liver Dis* 1989; 9: 103-11.
- Bradwell AR, Stokes RP, Johnson GD. Atlas of Autoantibody Patterns. The Binding Site edit., 1997, 27-55.
- Bradwell AR, Stokes RP, Mead GP. Advanced Atlas of Autoantibody Patterns. The Binding Site edit., 1999, 17-28, 78-105.
- Cebecauer L, Lupač J. Standardní operační postup – SOP – hodnocení obrazů fluorescence autoprotilátek na buňkách HEp-2. Dynex, Praha 2006.
- Czaja AJ. Autoimmune Liver Disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2003, 19(3), 232-242.
- Humbel RL. Auto-anticorps et maladies auto-immunes, 2e édition, Elsevier, 1997, 148-165.
- Invernizzi P, Selmi C, Gershwin ME. Antimitochondrial Antibodies. In *Autoantibodies*, 2nd Edition, Schoenfeld Y, Gershwin ME, Meroni PL editors, Elsevier, Amsterdam-Boston-Heidelberg-London-New York-Oxford-Paris-San Diego-San Francisco-Singapore-Sydney-Tokyo, 2006, 473-477.
- Johanet C. Auto-anticorps et hépatites in Auto-anticorps Actualités, Inst.Pasteur, Jun 23, 2000
- Karim AR. http://www.ii.bham.ac.uk/clinicalimmunology/CISimagelibrary/SLALP_Ab.htm
- Leung PSC, Manns MP, Coppel RL, Gershwin ME. Detection of Antimitochondrial Autoantibodies in Primary Biliary Cirrhosis and Liver Kidney Microsomal Antibodies in Autoimmune Hepatitis. In *Manual of Molecular and Clinical Laboratory Immunology*, 7th Edition, ASM Press, Washington, D.C., 2006, 1082-1090.
- Leung PSC, Obermayer-Straub P, Manns MP, Ansari A, Gershwin ME. Inflammatory Hepatobiliary Cirrhosis. In *Clinical Immunology*, 2nd Edition, Rich R.R. et al. editors, Vol. 2, Chapter 88, 88.1-88.14.
- Mayer W, Scheper T, Jansen N, Komorowski L, Probst C, Schlumberger W, Bogdanos D, Stöcker W. A comprehensive line immunoassay for the detection of autoantibodies in primary biliary cirrhosis (PBC) In *Autoantigens, Autoantibodies, Autoimmunity*, Vol 5, Conrad K, Chan EKI, Fritzler MJ, Sack U, Shoenfeld Y, Wiik AS (Eds.), PABST, Lengerich, Berlin, Bremen, Miami, Riga, Viernheim, Wien, Zagreb, 2007, 323-324.
- Norman GL, Lee L, Shums Z, Bogdanos D-P, Worman HJ, Krawitt EL, Lejny P, Aoki C, Vergani D, Gershwin ME. Enhanced detection and characterization of primary biliary cirrhosis patients with M2 EP(MIT3), gp120, and sp100 ELISA assays. Poster at Annual AMLI meeting, Denver, Colorado, 2005, August 21-24.
- Selmi C, Muratoro P, Podda M, Bianchi FB. Smooth Muscle Antibodies. In *Autoantibodies*, 2nd Edition, Y.Schoenfeld, M.E. Gershwin, P.L.Meroni editors, Elsevier, Amsterdam-Boston-Heidelberg-London-New York-Oxford-Paris-San Diego-San Francisco-Singapore-Sydney-Tokyo, 2006, 487-491.
- Speičienė S, Liakina V, Irnius A, Naraškevičienė J. Autoantibodies in the Diagnosis of Autoimmune Liver Disease. *Acta medica Lituanica* 2001, 8(1), 7-14.
- Strassburg CP, Manns MP. Liver Cytosol Antigen Type I Autoantibodies, Liver Kidney Microsomal Autoantibodies, and Liver Microsomal Autoantibodies. In *Autoantibodies*, 2nd Edition, Y.Schoenfeld, M.E. Gershwin, P.L.Meroni editors, Elsevier, Amsterdam-Boston-Heidelberg-London-New York-Oxford-Paris-San Diego-San Francisco-Singapore-Sydney-Tokyo, 2006, 463-471.
- Strassburg CP, Manns MP. Autoantibodies and Autoantigens in Autoimmune Hepatitis. *Semin Liver Dis* 2002, 22(4), 339-351.
- Terjung B, Worman HJ, Herzog V, Sauerbruch T, Spengler U. Differentiation of antineutrophil nuclear antibodies in inflammatory bowel and autoimmune liver diseases from antineutrophil cytoplasmic antibodies (p-ANCA) using immunofluorescence microscopy. *Clin Exp Immunol* 2001; 126: 37-46.
- Terjung B, Spengler U. Role of auto-antibodies for the diagnosis of chronic cholestatic liver diseases. *Clin Rev Allergy Immunol* 2005; 28(2): 115-133.
- Terjung B, Bogsch F, Klein R, Söhne J, Reichel C, Wasmuth JC, Beuers U, Sauerbruch T, Spengler U. Diagnostic accuracy of atypical p-ANCA in autoimmune hepatitis using ROC- and multivariate regression analysis. *Eur J Med Res*. 2004; 9(9): 439-448.
- Treichel U, Meyer zum Büschenfelde K-H. Liver Membrane Autoantibodies. In *Autoantibodies*, Peter J.B., Schoenfeld Y. editors, Elsevier, Amsterdam-Lausanne-New York- Oxford-Shannon-Tokyo, 1996, 467-473.
- Whittingham S, Mackay IR. Smooth Muscle Autoantibodies. In *Autoantibodies*, Peter J.B., Schoenfeld Y. editors, Elsevier, Amsterdam-Lausanne-New York- Oxford- Shannon-Tokyo, 1996, 767-773.
- Zachou K, Rigopolou E, Dalekos GN. Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis: important tools in clinical practice and to study pathogenesis of the disease. *J.Autoimmun. Diseases* 2004; 1(1): 2.
- Zhao Z, Yan HP, Tan ZF, Feng X, Liu Y, Cui D, Ma SM, Li WH, Zhang HP. The significance of anti-soluble liver antigen/liver-pancreas in diagnosing and typing autoimmune hepatitis. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, 2007; 15(4): 283-286. Article in Chinese.