

## ИНСТРУМЕНТАЛНИ МЕТОДИ И ДИАГНОСТИЧНИ АВТОАНТИТЕЛА ПРИ ПАЦИЕНТИ С ПРОГРЕСИВНА СИСТЕМНА СКЛЕРОЗА ЗА ОПТИМИЗИРАНЕ НА РАННАТА ДИАГНОСТИКА

Цв. Йонева<sup>1</sup>, Е. Красиминова<sup>2</sup>, Д. Калинова<sup>1</sup>, Е. Иванова-Тодорова<sup>2</sup>,  
Цв. Великова<sup>2</sup>, Я. Здравкова<sup>1</sup>, И. Шейтанов<sup>1</sup>, Д. Кюркчиев<sup>2</sup> и Р. Рашков<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Клиника по ревматология, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, Катедра по вътрешни болести, МУ – София

<sup>2</sup>Лаборатория по клинична имунология, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“,

Катедра по клинична лаборатория и клинична имунология, МУ – София

## INSTRUMENTAL METHODS AND DIAGNOSTIC AUTOANTIBODIES IN PATIENTS WITH PROGRESSIVE SYSTEMIC SCLEROSIS TO OPTIMIZE AN EARLY DIAGNOSIS

Tsv. Yoneva<sup>1</sup>, E. Krasimirova<sup>2</sup>, D. Kalinova<sup>1</sup>, E. Ivanova-Todorova<sup>2</sup>,  
Tsv. Velikova<sup>2</sup>, Y. Zdravkova<sup>1</sup>, I. Sheytanov<sup>1</sup>, D. Kyurkchiev<sup>2</sup> and R. Raskov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Clinic of Rheumatology, University Hospital "Sv. Ivan Rilski",

Department of Internal Medicine, Medical University – Sofia

<sup>2</sup>Laboratory of Clinical Immunology, University Hospital "Sv. Ivan Rilski",

Department of Clinical Laboratory and Clinical Immunology, Medical University – Sofia

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| <b>Резюме:</b>                  | <p>Целта на настоящото изследване е оптимизиране на ранната диагностика на прогресивната системна склероза (ПСС) и създаване на алгоритъм на поведение при тези болни чрез изследване на широк панел от автоантитела и инструментални методи на изследване. В проучването бяха включени 10 пациенти от женски пол – 7 със съмнение за ранна ПСС и 3 новодиагностицирани с ПСС, на които бяха проведени капиляроскопия, функционално изследване на дишането, компютърна томография, както и определяне на антинуклеарни антитела (ANA) чрез индиректна имуофлуоресценция и имуоблот за 13 типични за ПСС автоантитела. При изследване на микроциркулацията чрез видеокапиляроскопия беше установено, че всички пациенти проявяват поне един от морфологичните маркери на дезорганизация на капилярното русло. При пациентите с данни за системно заболяване на съединителната тъкан най-често срещан е ранният капиляроскопски склеродермен модел – 5 от болните. При 9 от пациентите установихме данни за белодробно ангажиране, като 4 от тях – с рестриктивни промени. При 8/10 болни установихме наличие на ANA, а при 6/10 – наличие на антитела срещу конкретни склеродермни антигени като: РНК полимераза III (3 болни), центромер-асоциирани протеини (CENP) (2 пациенти), Ro-52 (по 2 болни) и Th/To (1 пациент). Още при ранна ПСС са налице повечето органни увреди, като бяха установени асоциации между тях и склеродерма-специфичните антитела. Нашите данни потвърждават, че абнормната капиляроскопска картина, промените в белодробната функция заедно със специфични за ПСС антитела показват голяма вероятност за развитие на дефинитивна ПСС, докато липсата на антитела по-скоро намалява тази възможност.</p> |
| <b>Ключови думи:</b>            | прогресивна системна склероза, автоантитела, капиляроскопия, белодробна функция, ранна диагностика   |
| <b>Адрес за кореспонденция:</b> | <i>e-mail: katty_iv@yahoo.com</i>  |
| <b>Abstract:</b>                | The aim of this study was to optimize the early diagnosis of progressive systemic sclerosis (SSc) and to propose an algorithm for management in these patients by studying a wide panel of autoantibodies and through instrumental methods. The study included 10 female patients – 7 with suspected early SSc and 3 newly diagnosed with SSc patients who had clinical and instrumental data  |

|  |   |
|--|---|
| <p><b>Key words:</b></p> <p><b>Address for correspondence:</b></p> | <p>(capillaroscopy, pulmonary function tests, computed tomography) and immunoassays (determination of antinuclear antibodies, ANA, by indirect immunofluorescence and immunoblotting 13 typical SSc antigens). We found that all patients exhibited at least one of the morphological markers of disorganization of the microcirculation. In patients with a history of systemic autoimmune disease, the most common pattern is the early scleroderma model – half of the patients. In 9 patients we found features of lung injury, 4 of them – with restrictive changes. In 8/10 patients we found the presence of ANA, where in 6/10 – the presence of antibodies against specific antigens for scleroderma: against RNA polymerase III (3 patients) against centromere-associated protein (CENP) (2 patients) and Ro-52 (2 patients), against Th/To (1 patient). Even in early SSc, there are many organ damages and we found associations between them and scleroderma specific antibodies. Our data confirm that abnormal capillaroscopy picture, changes in lung function in combination with SSc-specific antibodies indicates a high probability of developing clinically definite SSc while lacking of antibodies rather decreases this opportunity.</p> <p>progressive systemic sclerosis, autoantibodies, capillaroscopy, pulmonary function, early diagnosis</p> <p><i>e-mail: katty_iv@yahoo.com</i></p> |
|--|---|

Прогресивната системна склероза (ПСС) е най-често срещаната форма на склеродермия и се дефинира като хронично мултисистемно заболяване на съединителната тъкан, характеризиращо се с микроангиопатия, фиброзиране на кожата и вътрешните органи и имунна дисрегулация с образуване на специфични автоантитела. Типични за заболяването са висока хетерогенност, развитие на трайни атрофични промени, непредвидим ход, висока смъртност и относителна резистентност към терапия [16, 17].

ПСС се разделя на три подформи, като първата се означава като лимитирана (ограничена) кожна форма и засяга кожата на крайниците до нивото на лактите и колената, а могат да бъдат засегнати и лицето и шията. Обикновено се асоциира с лека към умерена органна фиброза. Втората форма е дифузната, изявяваща се с дифузно кожно засягане, което включва бедра, рамена и торс, кореспондиращо с по-тежки органи поражения. Третата форма обединява в себе си множеството припокриващи се с ПСС аутоимунни заболявания, включващи: системен лупус, аутоимунен миозит, ревматоиден артрит, васкулити [16].

ПСС е типично системно аутоимунно заболяване, като причините и механизмите за възникване не са напълно изяснени. Допуска се генетично предразположение, свързано с някои алели от HLA системата, като HLA-A1, HLA-B8, HLA-DR5, полова предиспозиция, както и влияние на различни фактори на средата: физични въздействия (травми, вибрации, ниски температури); химични вещества (ароматни въглеводороди, поливинилхлорид, силициев двуокис); ме-

дикаменти (блеомицин, силикони); остри и хронични инфекции, ендокринни нарушения, физическа и психическа умора, стрес [1, 18, 19, 28].

В патогенезата на системната склероза играят роля три основни патогенетични процеса: увреждане на малките съдове и развитие на васкулопатия, отключване на аутоимунен отговор и развитие на генерализирана фиброза [2, 30]. Увреждането на съдовия ендотел играе централна роля в патогенезата, като все още не са изяснени факторите, отключващи патологичния процес. Установено е, че ендотелните клетки са не само пасивни реципиенти на съдовата увреда, но вземат активно участие в развитието на възпалителния процес в съдовата стена [12]. В процеса на съдово увреждане, наред с ендотелните клетки участват и растежни фактори като VEGF (съдовоендотелен растежен фактор), PDGF (тромбоцитен растежен фактор), провъзпалителни цитокини като TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 [24]. Вторият ключов процес в патогенезата на ПСС е аутоимунният отговор – клетъчен и хуморален, като аутоантителата са честа находка при тези болни. Някои автори разделят антителата, позитивиращи се при ПСС, на две групи – такива, които могат да имат пряка патогенетична роля (антиендотелноклетъчни антитела, насочени срещу фибробластите и/или колагенезата). Втората група антитела, насочени срещу различни нуклеарни антигени (ANA), са антитела срещу: Scl-70, CENP, RNA polymerase, Th/To, за които липсват данни за пряко патогенетично действие, но са незаменими в диагностичния процес [30].

Установяването на аутоантитела не е достатъчно за прецизна диагноза и наред с него се

използват множество инструментални методи. Според EULAR Scleroderma trials and research (EUSTAR) констелацията между Raynaud's феномен, „puffy fingers“ и наличието на ANA представлява „червен флаг“ за съмнение за ранна склеродермия [23, 25]. Поради това успоредно с определянето на ANA, капиляроскопията е важна диагностична процедура при оценката на болни със синдром на Raynaud. Капиляроскопията присъства в класификационните критерии за ПСС, като се предполага, че първите капиляроскопски промени предхождат с години типичния склеродермен модел. Много клинични проучвания показват нейната приложимост като диагностичен инструмент в много ранните фази на болестта [4, 15, 23].

Белодробното засягане е друга честа проява при ПСС и е основна причина за смъртност, поради което инструменталните изследвания на белодробната функция са изключително важни в диагностичния арсенал. Други диагностични методи като соноеластографията и термографията акцентират върху оценка на промените в структурата и микроциркулацията на кожата и подкожната тъкан и служат за откриване на ранни промени при ПСС [13, 32].

Използването на комбинация между инструментални изследвания и откриването на специфични автоантитела би позволило поставяне на диагноза в ранните стадии на заболяването. Това би могло да има и предиктивна стойност за откриване на болни с висок риск от усложнения, като дигитални улцерации и органни поражения, което би позволило ранно започване на подходящо лечение [29].

**Целта** на настоящото изследване е оптимизиране на ранната диагностика на прогресивната системна склероза и създаване на алгоритъм на поведение при тези болни чрез изследване на широк панел от автоантитела, установяването на капиляроскопски находки и данни от изследване на белодробната функция. Наред с това се цели уточняване ролята на описаните диагностични процедури за разпределението и честотата на заболяването, както и връзката с определени органни поражения и по-бързата еволюция.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

### Пациенти

В проучването бяха включени 10 последователни болни на средна възраст от 33 до 53 години (средно 45.2 год.), всички от женски пол, подбрани проспективно по следните критерии:

1. Хоспитализирани болни със съмнение за ранна ПСС (с прояви на Raynaud's феномен и „puffy fingers“) – 7 пациенти.

2. Новодиагностицирани пациенти с доказана диагноза ПСС съгласно класификационните критерии на ACR/EULAR (2013) с давност по-малко от 6 месеца – 3 пациенти.

Болните бяха включвани в проучването след подписване на Информационно съгласие, като изследването бе одобрено от Етичната комисия към МУ – София и УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, София.

### Клинични и инструментални методи

На всички пациенти е направен физикален преглед по системи и е проведена видеокапиляроскопия с качествен и полуколичествен анализ. Капиляроскопският модел е определен като начален, активен и късен. Наред с това на всички пациенти е проведено изследване на белодробната функция чрез функционално изследване на дишането – витален капацитет (ФИД-ФВК), форсиран витален капацитет (FVC) и белодробен дифузионен капацитет (DLCO) с мембранна и алвеоларна фаза за установяване на ранни нарушения в белодробната функция. При откриването на такива се провеждаше ЕхоКГ и се определяше налягането в а. pulmonalis. При пациентите беше използвана компютърна томография с висока резолюция с цел установяване на белодробни изменения.

### Имунологични методи

Всички пациенти бяха изследвани за антинуклеарни антитела (ANA) чрез:

1. Индиректна имунофлуоресценция (IIF) върху субстрат HEp-2 клетки (Anti-nuclear antibodies HEp2, Biosystems, Spain) – беше установен титър на ANA в серумите на 10-те пациенти.

2. Имуноблот техника, включваща 13 различни антигени, разпознавани от типични за ПСС ANA автоантитела (Scl-70; CENPA; CENP B; RP11; RNA polymerase III; fibrilarin; NOR90; Th/To; PM/SCL100; PM/Sci75; Ku; PDGFR; Ro52) (Euroimmun, Germany) – бяха установени типичните за заболяването специфични ANA автоантитела.

Тестовите бяха проведени, като стриктно се спазваха инструкциите на производителя.

### Статистически методи и софтуер

За анализ на данните са използвани дескриптивна статистика и софтуер Microsoft Office Excel 2007.

## РЕЗУЛТАТИ

### Нозологични единици и синдроми – класификация

При трима пациенти бе поставена диагноза ПСС съгласно класификационните критерии на ACR/EULAR (2013) въз основа на клиничните, лабораторните, имунологични и хистологични изследвания. При 1 пациент бяха установени некротични кожни лезии без типична картина на склеродермия, един беше с картина на ревматоиден артрит, двама – на припокриващо ревматично заболяване. Четирима пациенти се характеризираха с Raynaud-феномен, доказан с клинични и капиляроскопски данни. Тези пациенти показват стигми на склеродермия (puffy fingers) и ANA в серума. В табл. 1 е представено разпределението на пациентите по нозологични единици.

Таблица 1. Нозологична принадлежност на болните

| Вид нозологична единица | Брой болни |
|-------------------------|------------|
| ПСС                     | 3 /10      |
| Некротичен васкулит     | 1 /10      |
| Припокриващ синдром     | 1 /10      |
| Ревматоиден артрит      | 1 /10      |
| Синдром на Raynaud      | 4 /10      |

### Капиляроскопски данни

При проведеното изследване на микроциркулацията (капилярното русло) чрез видеокапиляроскопия беше установено, че всички пациенти проявяват поне един от морфологичните маркери на дезорганизация на микроциркулацията, вкл. гигантски капиляри, микрохеморагии, загуба на капиляри, аваскуларни зони и неоангиогенеза. При осем от болните бе налице типична капиляроскопска картина на системна склероза и само при двама имаше данни за синдром на Raynaud, без такива за системно заболяване на съединителната тъкан (СЗСТ). При пациентите с данни за СЗСТ най-често срещан е ранният капиляроскопски склеродермен модел – 5 от болните, при 3 има активен и при нито един късен капиляроскопски модел. Данните са представени в табл. 2.

### Данни от функционалното изследване на белодробната функция

При провеждане на изследване на белодробната функция чрез функционално изследване на дишането – витален капацитет (ФИД-ВК), форсиран витален капацитет (FVC) и белодробен дифузионен капацитет (DLCO) с мембранна и алвеоларна фаза за детектиране на ранни нарушения в белодробната функция и ком-

пютърна томография с висока резолюция, установихме, че 4 от пациентите имат рестриктивни промени. При трима от пациентите получихме данни за белодробно ангажиране при тотален белодробен капацитет TLC < 75% от предиктивния и при FVC < 80% от предиктивния. При нито един от пациентите не се намериха данни за пулмонална хипертония или ангажиране на сърдечно-съдовата система.

Таблица 2. Разпределение на болните по капиляроскопски находки

| Находка            | Брой болни |
|--------------------|------------|
| Загуба на капиляри | 3/10       |
| Уголемени капиляри | 7/10       |
| Гигантски капиляри | 7/10       |
| Микрохеморагии     | 5/10       |
| Рамификация        | 0          |
| Модел:             |            |
| ранен              | 5/10       |
| активен            | 3/10       |
| късен              | 0          |
| Синдром на Raynaud | 2/10       |

### Данни от изследването на автоантитела

По отношение на скриниране на серумите на пациентите за наличие на автоантитела, свързани с ПСС, при 8 болни бяха установени ANA в титър от 1:80 до повече от 1:1280. Този титър на положителни ANA при 6 от болните корелира и с наличието на специфични антитела, насочени срещу конкретни склеродермни антигени. При двама от пациентите не бяха установени специфични автоантитела, а двама от пациентите са с отрицателен имуоблот метод за специфични за ПСС антитела при положителен титър за ANA (табл. 3).

Таблица 3. Разпределение на резултатите за наличие на ANA антитела и специфичен панел антитела, срещани се при пациенти със системна склероза

| Пациент | ANA скрининг | Наличие и вид антитела, изследвани на имуоблот |
|---------|--------------|--|
| 1       | 1:80         | отрицателен                                    |
| 2       | отрицателен  | отрицателен                                    |
| 3       | > 1:1280     | анти-CENP-A; анти-CENP-B                       |
| 4       | > 1:1280     | анти-RNAP-III (155kDa); анти-PM-Scl75          |
| 5       | отрицателен  | отрицателен                                    |
| 6       | 1:640        | отрицателен                                    |
| 7       | 1:80         | анти-RNAP-III (155kDa); анти-Th/To             |
| 8       | 1:160        | анти-RNAP-III (155kDa);                        |
| 9       | > 1:1280     | анти-CENP-A; анти-CENP-B; анти-Ro52            |
| 10      | 1:80         | анти-Ro52                                      |

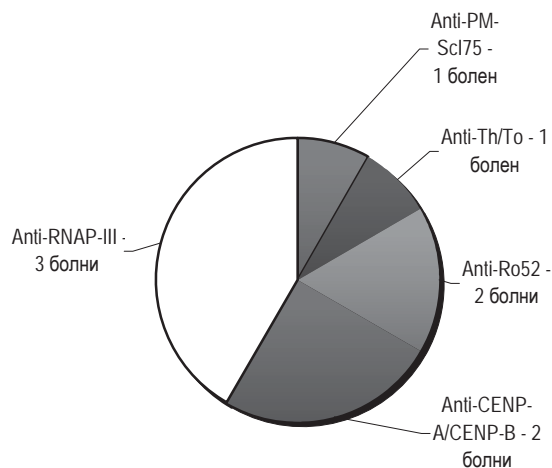
Анализът на данните за разпределението на автоантителата, типични за ПСС, показва, че най-често срещаните антитела са тези, насочени срещу РНК полимераза III (3 болни), като само при 1 пациент е установено припокриване с класическите анти PM-Scl-75 антитела (фиг. 1). От фигурата е видно, че втори по разпространение са антителата, насочени срещу различните форми на центромер-асоциирани протеини (CENP) и Ro-52, съответно по 2 болни. В най-малък брой от пациентите са открити антитела, насочени срещу Th/To – РНК свързани протеини – 1 пациент.

#### Асоциации между клиничните, инструменталните и имунологичните данни

Анти-RNAP III автоантителата се наблюдават при пациенти с кожен васкулит, артрит, интерстициално белодробно заболяване, понижаване на DLCO и бъбречно засягане. Анти-CENP бяха установени при болни с кожно засягане, вкл. васкулит с дигитални улцерации и интерстициално белодробно заболяване, както и понижен белодробен дифузионен капацитет. При болните с антитела срещу Ro-52 се наблюдават кожни промени и артрит, без ангажиране на

вътрешни органи. При пациент с антитела срещу PM/Scl-75 и RNAPIII, се наблюдава кожен васкулит, интерстициална белодробна болест и бъбречно засягане (фиг. 2).

На табл. 4 са представени автоантителата и корелацията им с белодробно засягане при изследваната група пациенти.



Фиг. 1. Разпределение на автоантителата, специфични за ПСС, по брой пациенти и процентно разпределение



Фиг. 2. Връзка между системна склероза-специфичните Ат и различни клинични прояви: Асоциация между някои клинични характеристики и А. анти-RNAP III; Б. анти-CENP, В. анти-Ro52

Таблица 4. Автоантителата при белодробно ангажиране

| Автоантитяло  | Процент болни с наличие на автоантитела | Корелация с белодробно засягане |
|---------------|---|---------------------------------|
| Анти-RNAPIII  | 3/10                                    | ↓DLCO                           |
| Анти-CENP     | 2/10                                    | ↓DLCO, фиброза                  |
| Анти-PM/Scl75 | 1/10                                    | ↓DLCO, фиброза                  |

#### ОБСЪЖДАНЕ

Системната склероза е аутоимунно заболяване, характеризиращо се със засягане както на кожата, така и на вътрешните органи, което в резултат може да доведе до тежка инвалидизация и смърт. Често началото на заболяването стартира със синдром на Raynaud, което може

да бъде белег и за много други нозологични единици, част от които СЗСТ. Това налага прецизна диагностика с използване на целия набор от клинични, инструментални и имунологични методи. Нашият анализ залага на комбинацията от клинично изследване, определяне на белодробна функция, капиляроскопия и установяване на типични за ПСС автоантитела. От пациентите, които изследвахме, трима бяха с доказана ПСС, докато при 7 имаше данни за възможна диагноза ПСС. Основната цел на нашето проучване беше прецизната диагностика на заболяването с използване на комбинирания подход, описан по горе.

Периферната микроангиопатия, характерна за ПСС, може да бъде разпозната рано чрез капиляроскопия. Микроваскуларните лезии могат да се класифицират в три различни модела – ранен, активен и късен, които са ясно различни от нормалния модел на капилярите [2, 4, 13]. При всички болни установихме морфологични маркери на дезорганизация на микроциркулацията, вкл. гигантски капиляри, микрохеморагии, загуба на капиляри, аваскуларни зони и неоангиогенеза (табл. 2). Характерната последователност на микроваскуларната увреда започва с уголемени и гигантски капиляри, последвана от загуба на капиляри и неоангиогенеза. При пациентите, включени в изследването и с данни за СЗСТ, най-често срещан е ранният капиляроскопски склеродермен модел – половината от нашите пациенти. При 3/10 има активен и при нито един – късен капиляроскопски модел. При осем от болните бе налице типична капиляроскопска картина на системна склероза и само при двама имаше данни за синдром на Raynaud, без такива за СЗСТ. По литературни данни уголемените и гигантски капиляри, загубата на капиляри и специфичните за системна склероза антитела са независими предиктори за развитие на дефинитивна системна склероза [4, 15]. Ранният модел се счита за най-важен и за фундаментален за ранната диагноза на системната склероза, както и за разграничаването ѝ от първичния синдром на Raynaud [10, 13, 23].

При всичките 10 пациенти бе проведено изследване на белодробната функция за установяване на интерстициална белодробна болест. Тя е най-честата белодробна проява при ПСС, като 40% от пациентите имат рестриктивен тип промени. Това се потвърждава и от автори, които коментират такъв тип промени в белодробната функция и при > 90% от аутопсираните пациенти с ПСС [5, 12]. Счита се, че има данни за белодробно ангажиране при TLC < 75% от предиктивния и при FVC < 80% от предиктивния [7,

32]. В нашето проучване такива стойности сме наблюдавали при трима от пациентите. При двама от тях тези промени са в комбинация с васкулит и дигитални улцерации, което говори за тежка ендотелна дисфункция и микроангиопатия. На базата на нашите резултати и литературните данни може да се направи извод, че изследването на белодробната функция, наред с капиляроскопията е важен инструментален подход в диагностиката на ПСС.

По литературни данни почти всички пациенти с ПСС (85-90%) имат позитивни ANA. От тях около 60-70% са позитивни за едно от трите т. нар. склеродерма-специфични автоантитела [7, 22]. Те включват антицентромерни (анти-CENP), антитопоизомеразни (анти-Scl-70) и анти-RNA polymerase III. Четвъртото антитяло, което се идентифицира при по-малък процент от болните, и то при тези с припокриващи синдроми, е анти-PM-Scl [8]. Налице са и две допълнителни антитела, високоспецифични за ПСС – анти-U3RNP (anti-fibrillarin) и анти-Th/To, които имат типичен нуклеарен образ на IIF.

В нашето проучване наличието на антитела, насочени срещу РНК полимераза III, установихме при 3 от болните, а само при 1 пациент – припокриване с класическите анти-PM-Scl75 антитела. Тези специфични антитела се свързват с дифузна кожна склероза, ставно засягане и вероятно развитие на т. нар. склеродерма-асоциирана ренална криза [8]. При тези пациенти наблюдавахме артрит/артралгии, КТ данни за пулмофиброза и понижение на белодробния дифузионен капацитет. Едната от болните бе с картина на тежък васкулит с дигитални улцерации по пръстите на ръцете и стъпалата, имаше бъбречно засягане с нискостепенна протеинурия. При нея освен антитела, насочени срещу РНК полимераза, установихме и анти-PM-Scl75 антитела. Описаните клинични констелации не са типични за болните с този вид антитела.

Втори по разпространение сред нашите болни (двама пациента) са антителата, насочени срещу различните форми на центромер-асоциирани протеини. Те се свързват с изява на пулмонална хипертония и гастроинтестинално засягане, по-специално езофагеален хипомотилитет [25, 31]. Като цяло анти-CENP-A и анти-CENP-B се свързват с по-благоприятно протичане на заболяването и по-рядко с развитие на интерстициална белодробна фиброза и бъбречно засягане [27]. При нашите пациенти клиничната картина е на симптоматичен васкулит с дигитални улцерации и белодробна фиброза с намалени FVC и дифузионен капацитет без раз-

витие на пулмонална хипертония и изолирано кожно засягане, както и без ангажиране на вътрешни органи (фиг. 2 Б).

В нашето проучване при един от пациентите, наред с антитела срещу RNA polymerase III открихме и антитела, насочени срещу Th/To – РНК свързани протеини. По литературни данни Th/To, заедно с антителата, насочени срещу Scl-70 антигена, се свързват с изява на тежки форми на интерстициално белодробно засягане, пулмонална хипертония и бъбречна увреда [6]. Тези антитела могат да се използват като прогностичен маркер за проследяване и навременно терапевтично овладяване на усложненията, получени при по-агресивен ход на протичане на болестния процес. При тези пациенти клиничната картина е на припокриващо ревматично заболяване – артрит по ревматоиден тип, синдром на Съогрен и стигми на ПСС [11]. При конкретния пациент подобна е и клиничната картина, наблюдавана от нас.

Двама от пациентите са с негативен имуноблот при наличие на ANA, установени с IIF. При тези болни клиничната картина беше на ставен синдром, типична капиляроскопска картина на СЗСТ, като при единия има данни за интерстициално белодробно заболяване с функционални нарушения и намаление на белодробния дифузионен капацитет. Наличието на ANA и липсата на автоантитела, типични за ПСС, на фона на клиничната картина, дават основание да се счита, че тези пациенти вероятно страдат от друг вид СЗСТ.

Антителата, характерни за ПСС, могат да се разделят по степен на кожно засягане на две основни групи – наблюдавани при пациенти с дифузно и с ограничено кожно ангажиране [11] (табл. 5).

**Таблица 5. Характерни автоантитела при болни с ПСС и различно кожно ангажиране**

| <i>Дифузно кожно ангажиране</i> | <i>Ограничено кожно ангажиране</i> |
|---------------------------------|------------------------------------|
| Anti-fibrilarin                 | Anti-CENP                          |
| AntiU3-RNP                      | Anti-Pm/Scl                        |
| Anti-Scl-70                     | Anti Th/To                         |
| Anti-RNAP                       | AntiU1-RNP                         |

Освен предиктивна стойност по отношение степента на кожно засягане описаните автоантитела имат отношение към вида на органните поражения и изхода на болестта [20].

Антителата при ПСС са важен имунологичен маркер при поставяне на диагнозата заедно с клиничните прояви, капиляроскопската картина, резултата от кожната бипсия. Следвайки логи-

ката, заложената в нашето изследване, се опитаме да анализираме връзките между автоантитела, клинична картина, и данните от инструменталните изследвания (фиг. 2). Анализирайки връзката между отделните склеродерма-специфични антитела и органното ангажиране, установихме, че анти-RNAP III се асоциират с кожен васкулит, артрит, интерстициално белодробно заболяване, понижаване на DLCO, бъбречно засягане. Анти-CENP се асоциират с кожно засягане, вкл. васкулит с дигитални улцерации, интерстициално белодробно заболяване, понижен белодробен дифузионен капацитет. При болните с антитела срещу Ro-52 се наблюдават кожни промени и артрит, като няма ангажиране на вътрешни органи. Установени бяха антитела срещу PM/Scl75 само при една болна, и то в комбинация с анти-RNAP III, като пациентката беше с кожен васкулит и интерстициална белодробна болест и бъбречно засягане.

Асоциациите между автоантитела и капиляроскопските находки дават допълнителна информация в диагностиката и прогнозата на ПСС. Установено е, че анти-CENP и анти-Th/To антителата са предиктор за развитие на гигантски капиляри, а заедно с анти-RNAP III – и за загуба на капиляри [3, 9, 14]. При нашите пациенти гигантски капиляри се наблюдаваха най-често при болни с анти-CENP и анти-Ro52 в комбинация с анти-RNAP-III. Пациентите със загуба на капиляри (с късен склеродермен капиляроскопски модел) са били с анти-Ro52, комбинация между анти-Ro52 и анти-CENP-B и комбинация между анти-RNAP-III и анти-PM-Scl75. Най-честите антитела, които сме открили при болните с ранен капиляроскопски модел, са анти-RNAP-III, самостоятелно или в комбинация с анти-Th/To, и по-рядко на анти-CENP-B. По литературни данни при пациенти с наличие на няколко вида автоантитела се очаква по-бързо развитие на увреждането на микроциркулацията [20]. При двама от пациентите наблюдавахме капиляроскопска картина на първичен синдром на Raynaud, като при тях не се откриват специфични за ПСС антитела. Някои автори твърдят, че при такива пациенти вероятността да развият СЗСТ е под 15% [11].

Дигиталните улцерации представляват една от най-драматичните прояви на микроангиопатията при болните със системна склероза. Те се асоциират по-често с активния и късен капиляроскопски модел, характеризиращи се с нарастване на аваскуларните участъци и тежка загуба на капиляри. Дигитални улцерации се срещат по-често при болни с анти-CENP-B и анти-PM-Scl75 антитела [21]. При две от нашите болни

наблюдавахме дигитални улцерации и тежък кожен васкулит. Те изявиха особен капиляроскопски модел. При едната пациентка с активна ПСС бяха наблюдавани гигантски капиляри и хеморагии и бяха установени анти-CENP-B и анти-PM-Scl75 антитела. При другата получихме капиляроскопски данни за синдром на Raynaud и ранна ПСС с позитивни анти-CENP-A и анти-CENP-B антитела, и то с висока стойност. Абнормните находки при капиляроскопията, макар и без загуба на капиляри и неоангиогенеза в комбинация с антитела, които се асоциират с тежко съдово засягане, показват голяма вероятност за развитие на дигитални улцерации.

Множество проучвания доказват, че автоантителата, типични за склеродермия, се позитивират дълго преди развитието на клиничните симптоми, като при имунологичното проследяване е установено, че при малък процент от пациентите антителата се негативират, което е свързано с по-благоприятно протичане и изход от болестта [11, 20].

### ИЗВОДИ

1. В проучването установихме връзка между клиничната картина на синдром на Raynaud с определени капиляроскопски находки и наличие на определени специфични склеродермни автоантитела при болни със съмнение за ПСС.

2. Още при ранна ПСС са налице множество органични увреди, като се установиха асоциации между тях и склеродерма-специфичните антитела.

3. Последващото проследяване на болните би позволило определяне на предиктивната роля и прогностичната стойност на автоантителата, което би дало възможност за съответно мониториране и започване на ранно лечение при болните с лоши прогностични нива. От това следва, че при ранна ПСС лечението трябва да е агресивно, както при напредналите форми.

Анализирането на съвкупността от клиничните данни, инструменталните изследвания и имунологичната находка при болни със съмнение за ПСС и такива със сигурна диагноза би позволило ранното диагностициране на тези пациенти. Също така предложеният подход би допринесъл за класифициране на различните болни и създаване на алгоритъм на поведение за изследване, поставяне на диагноза ПСС и последващо проследяване на тези болни. В заключение, нашите данни потвърждават, че абнормната капиляроскопска картина, промените в белодробната функция, в комбинация със специфични за ПСС антитела показва голяма вероят-

ност за развитие на дефинитивна диагноза ПСС, докато липсата на специфични антитела по-скоро намалява тази възможност.

### Благодарности

*Този проект бе осъществен с финансовата помощ на Медицински университет – София, Грант № 77/2015 г, проект № 365/2015 г.*

### Библиография

1. Красмирова, Е., Д. Калинова, Ц. Великова, К. Тумангелова-Юзеир, Е. Иванова-Тодорова, В. Решкова, А. Копчев, Р. Рашков и Д. Кюркчиев. Разширен имунологичен панел в диагностиката на прогресивна системна склероза. *Ревматология*, **24**, 2016; № 2, 35-51.
2. Campbell, P. M. et E. C. LeRoy. Pathogenesis of systemic sclerosis: a vascular hypothesis. *Semin Arthritis Rheum*, **4**, 1975, 351-368.
3. Chang, M. et al. Analysis of autoantibodies againsts RNA polymerases using immunoaffinity-purified RNA polymerase I, II and III antigen in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Immunol Immunopath*, **89**, 1998, 71-78.
4. Cutolo, M. Capillaroscopy in rheumatic diseases. From the XVIII to the XXI century. In: *Atlas of Capillaroscopy in Rheumatic Diseases*. 1st edition, Vol. 1. Milano: Elsevier Srl, 2010, 103-111.
5. D'Angelo, W. A., A. T. Masi, L. E. Shulman. Pathologic observations in systemic sclerosis (scleroderma): a study of fifty-eight autopsy cases and fifty-eight matched controls. *Am J Med*, **46**, 1969, 428-440.
6. Douvas, A. S., M. Achetan, E. M. Tan. Identification of a nuclear protein (Scl-70) as a unique of human antinuclear antibodies in scleroderma. *J Biol Chem*, **254**, 1979, 10514-10522.
7. Fertig, N. et al. Anti-U11/U12 RNP antibodies in systemic sclerosis: A new serologic marker associated with pulmonary fibrosis. *Arthritis Rheum*, **61**, 2009, 958-966.
8. Hanke, K. et al. Antibodies against PM/Scl-75 and PM/Scl-100 are independent markers for different subsets of systemic sclerosis patients. *Arthritis Res Ther*, **11**, 2009, R22.
9. Harbid, J.A. et al. Antibodies from patients with connective tissue diseases bind specific subsets of cellular RNA-protein particles. *J Clin Invest*, **70**, 1982, 141-147.
10. Hirshl, M. et al. Transition from primary Raynaud phenomenon to secondary Raynauds phenomenon identified by diagnosis of an associated disease. Results of ten years of prospective surveillance. *Arthritis Rheum*, **54**, 2006, 1974-1981.
11. Ho, K. T et J. D. Reveille. The clinical relevance of autoantibodies in scleroderma. *Arthritis Res Therapy*, **5**, 2003, 80-93.
12. Humbert, M. et al. Early detection and management of pulmonary arterial hypertension. *Arthritis Rheum*, **63**, 2011, 3522-30.
13. Ingegnoli, F., P. Boracchi, C. Lubatti. A prognostic model based on nailfold capillaroscopy for identifying Raynauds phenomenon patients as high risk for development of a scleroderma spectrum disorders. *Arthritis Rheum*, **58**, 2008, 2174-2182.
14. Jacobsen, S., S. Ullman, G. Q. Shen, et al. Influence of clinical features, serum antinuclear antibodies; and lung function of survival of patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol*, **28**, 2001, 2454-2459.
15. Koenig, M, F. Joyal, Fritzler, et al. Autoantibodies and microvascular damage are independent predictive factors for

- progression of Raynauds phenomenon to systemic sclerosis. A twenty year prospective study of 586 patients with validation of proposed criteria for early systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*, 58, 2008, 3902-3912.
16. LeRoy, E. C., C. Black, R. Fleischmajer, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol*, 15, 1988, 202-205.
  17. LeRoy, E. C., T. A. Medsger, Jr. Raynaud's phenomenon: a proposal for classification. *Clin Exp Rheum*, 10, 1992, 485-489.
  18. Matucci-Cerinic, M. et Y. Ethienne. Optimistic outcomes in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*, 68, 2009, 1377-80.
  19. Mayes, M. D. et al. Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis Rheum*, 48, 2003, 2246-55.
  20. Nihtyanova, S. I. et C.P. Denton. Autoantibodies as predictive tools in systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol*, 6, 2010, 112-116.
  21. Phong, K., E., Diot, P. Clerson, et al. Clinical Features of Scleroderma Patients with or Without Prior and Current Digital Ulcers: Post hoc Analysis of a Nationwide Multicenter Cohort (InterAIR-Sclerodermie). *J Rheum*, 2009, 1470-1476.
  22. Reichlin, M. et al. Antibodies to a nuclear/nucleolar antigen in patients with polymyositis overlap syndromes. *J Clin Immunol*, 4, 1984, 40-44.
  23. Sebastiani, M., A. Manfredi, G. Vukutana, et al. Predictive role of capillaroscopic skin ulcer risk index in systemic sclerosis: a multicentric validation study. *Ann Rheum Dis*, 71, 2012, №1, 67-70.
  24. Sollberg, S., J. Peltonen, J. Uitto, S. Jimenez. Elevated expression of  $\beta 1$  and  $\beta 2$  integrins, intercellular adhesion molecule 1, and endothelial leukocyte adhesion molecule 1 in the skin of patients with systemic sclerosis of recent onset. *Arthritis Rheum*, 35, 1992, 290-298.
  25. Spencer-Green, G. Outcomes in primary Raynaud phenomenon: a metaanalysis of the frequency, rates, and predictors of transition to secondary diseases. *Arch Intern Med*, 158, 1998, 595-600.
  26. Spencer-Green, G., D. Alter, H. G. Welch. Test performance in systemic sclerosis: anti-centromere and anti-Scl-70 antibodies. *Am J Med*, 103, 1997, 242-248.
  27. Tan, E. M., G. P. Rodnan, I. Garcia, et al. Diversity of antinuclear antibodies in progressive systemic sclerosis: anti-centromere antibody and its relationship to CREST syndrome. *Arthritis Rheum*, 23, 1980; 617-625.
  28. Valentini, G., G. Cuomo, G. Abignano et al. Early systemic sclerosis: assessment of clinical and pre-clinical organ involvement in patients with different disease features. *Rheumatology (Oxford)*, 50, 2011, 317-23.
  29. Valentini, G., Vettori S., Cuomo G. Early systemic sclerosis: short-term disease evolution and factors predicting the development of new manifestations of organ involvement. *Arthritis Res Ther*, 14, 2012, R188.
  30. Varga J. et R. Lafyatis. Pathogenesis of systemic sclerosis. In: *Rheumatology*. Edited by: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, et al. ELSEVIER, Toronto, 2011, 1387-1402.
  31. Vazquez-Abad, D., S. Wallace, J. L. Senecal, et al. Anticentromere autoantibodies. Evaluation of an ELISA using recombinant fusion protein CENT-B as antigen. *Arthritis Rheum*, 37, 1994, 248-252.
  32. Walker, U.A., A. Tyndall et al. Clinical risk assessment of organ manifestations in systemic sclerosis: a report from EULAR Scleroderma Trials and Research group database. *Ann Rheum Dis*, 66, 2007, 754-763.

*Постъпила за печат на 17 януари 2017 г.*