ИННОВАЦИОННЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ РЕВМАТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Зав.кафедрой факультетской терапии ВолгГМУ

Доктор мед. наук профессор

А.Р.Бабаева

Социально значимые ревматические заболевания

1. **Воспалительные заболевания суставов и позвоночника**:

- Ревматоидный артрит
- Анкилозирующий спондилит
- Псориатический артрит
- Другие спондилоартриты.

2. **Системные заболевания соединительной ткани** :

Системная красная волчанка (СКВ)

Системная склеродермия (CCL)

Полимиозит/дерматомиозит

Клинически значимые ревматические заболевания

3. Системные васкулиты:

3.1 Полиангиит с гранулематозом (Вегенера)

3.2 Микроскопический полиангиит

3.3 Синдром Чарджа-Стросса (Churg-Strauss)

АНЦА-ассоциированные васкулиты

3.4 Ревматическая полимиалгия/Гигантоклеточный артериит

3.5 Неспецифический аортоартериит (болезнь Такаясу)

3.6 Геморрагический васкулит (Шейнлейн-Геноха)

Социально и клинически значимые ревматические заболевания

- Остеоартроз
- Подагра, подагрический артрит
- Заболевания внесуставных мягких тканей (периартриты, тендиниты, теносиновиты, бурситы, лигаментиты)
- Миопатии
- Фибромиалгия

Центральное место в лабораторной диагностике ревматических заболеваний занимают серологические тесты для обнаружения циркулирующих аутоантител

- **Основными маркерами ревматических заболеваний являются антинуклеарные антитела (АНА), ревматоидные факторы (РФ), антитела к циклическому цитруллинированному пептиду, антифосфолипидные антитела и антинейтрофильные цитоплазматические антитела .**
- Положительные результаты определения этих аутоантител входят в число диагностических критериев ряда системных ревматических заболеваний и могут использоваться при оценке активности и прогноза этих заболеваний. Кроме того, обнаружение аутоантител представляется важным для ранней диагностики и характеристики клинико-лабораторных субтипов ревматических заболеваний. По данным проспективных исследований, аутоантитела также могут служить предикторами развития аутоиммунных ревматических заболеваний.
- Особое внимание в последние годы уделяется изучению клинико-диагностического значения ревматоидного фактора и антител к цитруллинированным белкам/пептидам.
- Наряду с идентификацией аутоантител одним из ведущих аспектов диагностики ревматических заболеваний является исследование маркеров воспаления в крови (СОЭ, СРБ, цитокины, матриксные металлопротеазы, хемокины и т.д.)

Стандартные профили аутоантител для диагностики системных РЗ

СКВ: Антинуклеарный фактор (АНФ), анДНК, aSm, aRo/SS-A, aLa/SS-B, аРНП, антитела к кардиолипину – аКЛ, аС1q

РА: IgM/IgA РФ, антитела к цитруллинированным белкам – АЦЦП, АМЦВ, АКА, АПФ, антифилагриновые антитела, антитела к Ra 33, BiP (P-68)

Антифосфолипидный синдром: IgG/IgM аКЛ, IgG/IgM антитела к β_2-гликопротеину I – аβ_2-ГПI, волчаночный антикоагулянт – ВА)

ССД: aScl-70, антицентромерные антитела (АЦА), антинуклеолярные антитела (aTh/To, аРНК-полимеразе III, аРМ-Scl, аU1 РНП, антитела к фибриллагрину - аU3 РНП)

ПМ/ДМ: Антитела к аминоацил-синтетазам тРНК - Jo-1, PL-7, PL-12, EJ, OJ, KS; антитела к SRP, Mi-2, PM-Scl, KJ)

Стандартные профили аутоантител для диагностики системных РЗ

Системные васкулиты: цАНЦА, пАНЦА, антитела к протеиназе 3 и миелопероксидазе

Аутоиммунные гепатиты: АНФ, антитела к гладкой мускулатуре (SMA), микросомам печени и почек I типа – LKM1, цитоплазматическому антигену печени LC-1, растворимому антигену печени/поджелудочной железы SLA/LP, митохондриям – AMA-M2

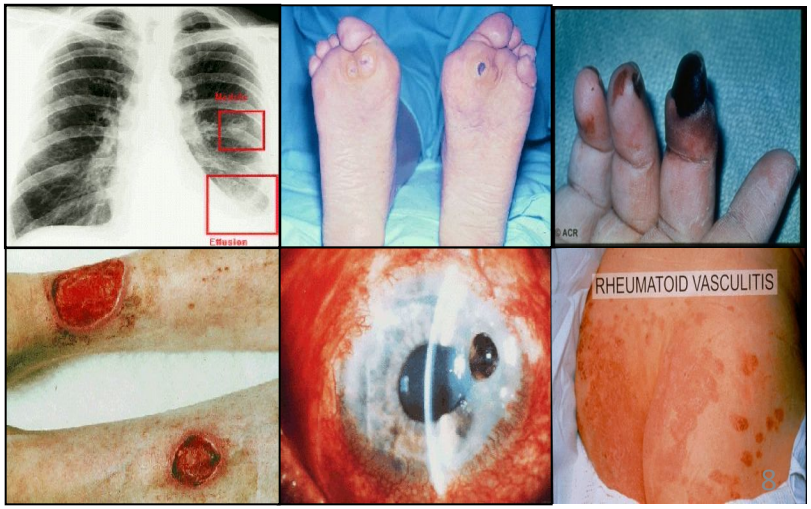
Воспалительные заболевания кишечника (Болезнь Крона, неспецифический язвенный колит): IgG/IgA антитела к Saccharomyces Cerevisiae – ASCA, пАНЦА, атипичные АНЦА

•

Ревматоидный артрит

Аутоиммунное ревматическое заболевание неизвестной этиологии, характеризующееся хроническим эрозивным артритом (синовитом), а в ряде случаев – с характерными внесуставными поражениями (*В.А.Насонова*).

- До **40% пациентов становятся нетрудоспособными в течение 5 лет** с момента постановки диагноза[2]
- Около **30% больных становятся полностью нетрудоспособными в течение первых 10 лет РА**



Основной диагноз РА *(шифры МКБ10)*

- **Серопозитивный РА (М05.8)**
- **Серонегативный РА (М06.0)**
- **Особые клинические формы РА**

  - Синдром Фелти (М05.0) – *нейтропения, спленомегалия, гепатомегалия, системные проявления*

  - **Болезнь Стилла, развивающаяся у взрослых (М06.1) –** *гектическая лихорадка, макулопапулезная сыпь, лейкоцитоз, нейтрофилез с палочкоядерным сдвигом, отрицательный РФ*

- **Вероятный РА**

КЛИНИЧЕСКАЯ СТАДИЯ

- Очень ранняя стадия: длительность до 6 месяцев
- Ранняя стадия длительность 6-12 мес.
- Развернутая стадия: длительность более 1 года + типичные проявления РА
- Поздняя стадия: длительность более 2 лет + выраженная деструкция суставов (3-4 стадия), наличие осложнений РА.

СТЕПЕНЬ АКТИВНОСТИ (DAS 28)

- DAS 28 < 2,6 – ремиссия
- DAS 28 2,6-3,2 – низкая (степень 1)
- DAS 28 3,3-5,1 – умеренная (степень 2)
- DAS28 >5,1 – высокая (степень 3)

ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА:

РФ, АЦЦП

РЕНТГЕНОЛОГИЧЕСКАЯ СТАДИЯ 1-4

ФК 1-4

ОСЛОЖНЕНИЯ

Ревматоидный артрит

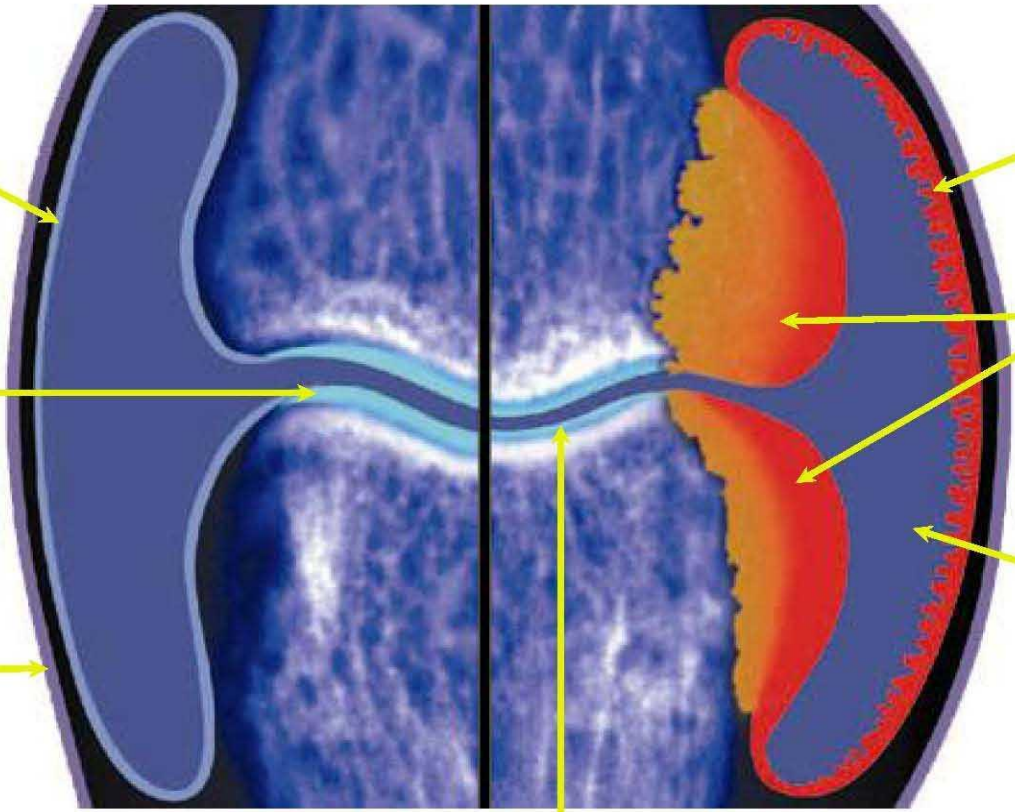
Суставные проявления

- Воспаление синовиальной мембраны - синовит
- Накопление медиаторов воспаления и продуктов распада в капсуле
- Усиление боли, вовлечение нервных окончаний
- Разрушения хряща
- Сужение просвета сустава
- Начало разрушения кости
- Деформация и потеря подвижности в суставе

Внесуставные проявления

- Ревматоидные узелки
- СС: васкулиты
- Легочные: гранулема, плеврит
- Глазные: склерит, ирит
- Неврологические: компрессионная нейропатия
- Почечные/печеночные: нефрит

Характеристики РА: Воспаление и деструкция сустава



Ревматоидный артрит – ранняя диагностика

- **Иммунологические тесты:** ревматоидный фактор (РФ), исследование антицитрулиновых антител (АЦЦП)

- **Инструментальные методы:** рентгенография, магнито-резонансная терапия, ультразвуковое исследование суставов костей,

- **Иммуногенетические исследования:** типирование опрежделенных человеческих лейкоцитарных антигенов – HLA

- **Артроскопия и биопсия синовиальной оболочки**

Ревматоидный артрит - диагностика

Критерии EULAR клинического подозрения на РА для врачей общей практики

- > 3 припухших сустава
- Вовлечение пястно- и плюснофаланговых суставов («+» симптомы «сжатия»)
- Утренняя скованность > 30 минут

Консультация ревматолога!

Диагностические критерии ACR (1987)

1. Утренняя скованность более 1 часа (>6 недель)
2. Припухлость не менее 3 суставов (>6 недель)
3. Артриты суставов кисти (>6 недель)
4. Симметричные артриты
5. Рентгенологические признаки
6. Подкожные узелки
7. Ревматоидный фактор

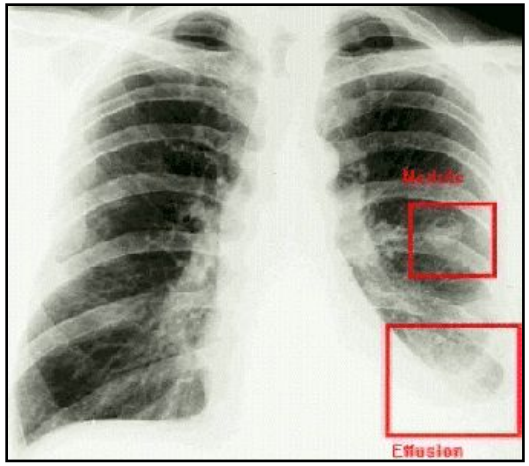
Диагностические критерии РА ACR / EULAR 2010

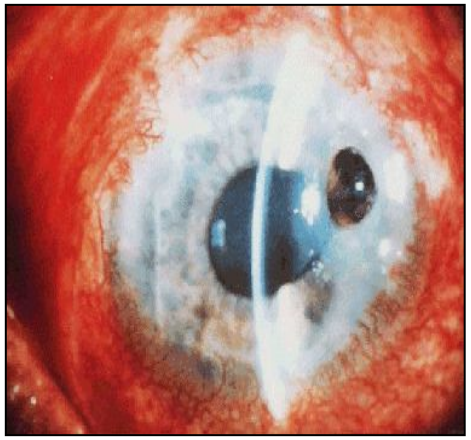
Поражение суставов	0-5 баллов
1 средний/крупный сустав	0
2-10 средних/крупных суставов	1
1-3 мелких сустава	2
4-10 мелких суставов	3
> 10 мелких суставов	5
Серология	0-3 балла
РФ (в клетки)– отр. АЦЦП АТ к цикл цитрулин пепт – отр.	0
1 Позитивный тест в низких титрах	2
Хотя бы 1 позитивный тест в высоких титрах	3
Длительность синовита	0-1 балл
< 6 недель	0
> 6 недель	1
Острофазовые показатели	0-1 балл
Нормальные и СОЭ, и СРБ	0
Повышение или СОЭ, или СРБ	1

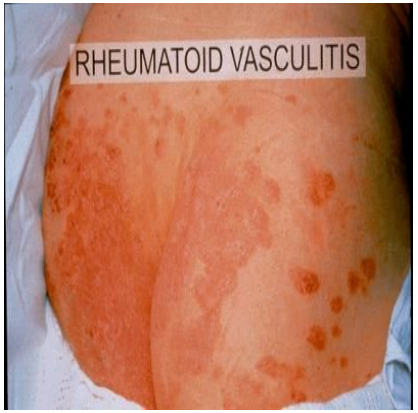
Счет ≥ 6 баллов указывает на определенный РА

EULAR Treat to Target Guidelines, Smolen J et al, Ann Rheum Dis 2010; 69: 631-9

Внесуставные проявления РА







Ревматоидный артрит

ФАКТОРЫ РИСКА (при оценке профиля пациента)

- Генетические факторы (семейный анамнез, другие аутоиммунные заболевания, HLA DR4, различные эпитопы HLA DRB1)
- Женский пол
- Курение
- Избыточная масса тела
- Инфекции (вирус ЭБ)

Неблагоприятные прогностические факторы при РА

Рекомендации JCR 2014[1]	Рекомендации EULAR 2013[2]
Наличие АЦП/РФ (высокий титр)	Наличие аутоантител (АЦП/РФ)
Повреждение суставов в начале болезни	Эрозия костной ткани в ранней фазе
Очень высокая активность болезни	Высокая активность болезни

АЦП — антитела к цитруллинированному пептиду; JCR — Японская коллегия ревматологов; EULAR — Европейская антиревматическая лига; РА — ревматоидный артрит; РФ — ревматоидный фактор.

Факторы неблагоприятного прогноза РА

- **Высокая активность РА**
- **Эрозивный артрит (прогрессирующее течение заболевания – обнаружение новых эрозий!)**
- **Серопозитивность по РФ**
- **Серопозитивность по АЦЦП**
- **Системные проявления**
- **Резистентность к терапии**

(учитывать при оценке профиля пациента!)

Выявление больных активным прогрессирующим РА

Клинические признаки	RG- и лабораторные признаки
•Сохранение утренней скованности > 15 мин. •≥3 припухших суставов •≥4 болезненных суставов • **Повышение показателя DAS (≥3.2)**	• **Новые эрозии** при рентгенографии или магнитно-резонансной томографии (МРТ) • Повышенный уровень СРБ (≥0.6 mg/dL) • Повышение СОЭ (>28 мм/ч по Westergren) • **Высокий уровень РФ** •**Высокий уровень АЦЦП**

Назначение ГИБП

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ РА

Иммунологические маркеры : антитела к иммуноглобулину G – РФ разных изотипов (IgM,IgA,IgG), к модифицированным белкам (цитрулинированному пепетиду), к тканевым и клеточным антигенам (PNA), антитела к коллагену 2 типа

Маркеры воспаления : СРБ, провоспалительные цитокины (ИФ, ФНО-а, ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-17 и т.д) хемокины (CXCL10, CXCL13, фракталкин), матриксные металло-протеазы

Изменение субпопуляций, функционального состояния иммуно-компетентных клеток (Т-лимфоциты, макрофаги), их рецепторного аппарата

Специфические белки, обнаруживаемые в плазме: цитруллинированные пептиды, белок **14-3-3-ŋ –новый маркер РА, гликопротеин семафорин4А - ко-стимулятор Т-лимфоцитов**

Иммунологические маркеры - антитела

- **Иммунологические маркеры :**
- антитела к иммуноглобулину G – РФ разных изотипов (IgM,IgA,IgG),
- к модифицированным белкам (цитрулинированному пептиду),
- к тканевым и клеточным антигенам (рибонуклеопротеидам - PNA), антитела к коллагену 2 типа

Маркеры воспаления

- СРБ
- провоспалительные цитокины (ИФ, ФНО-а, ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-17 и т.д)
- хемокины (CXCL10, CXCL13, фракталкин),
- матриксные металлопротеазы (ММР)

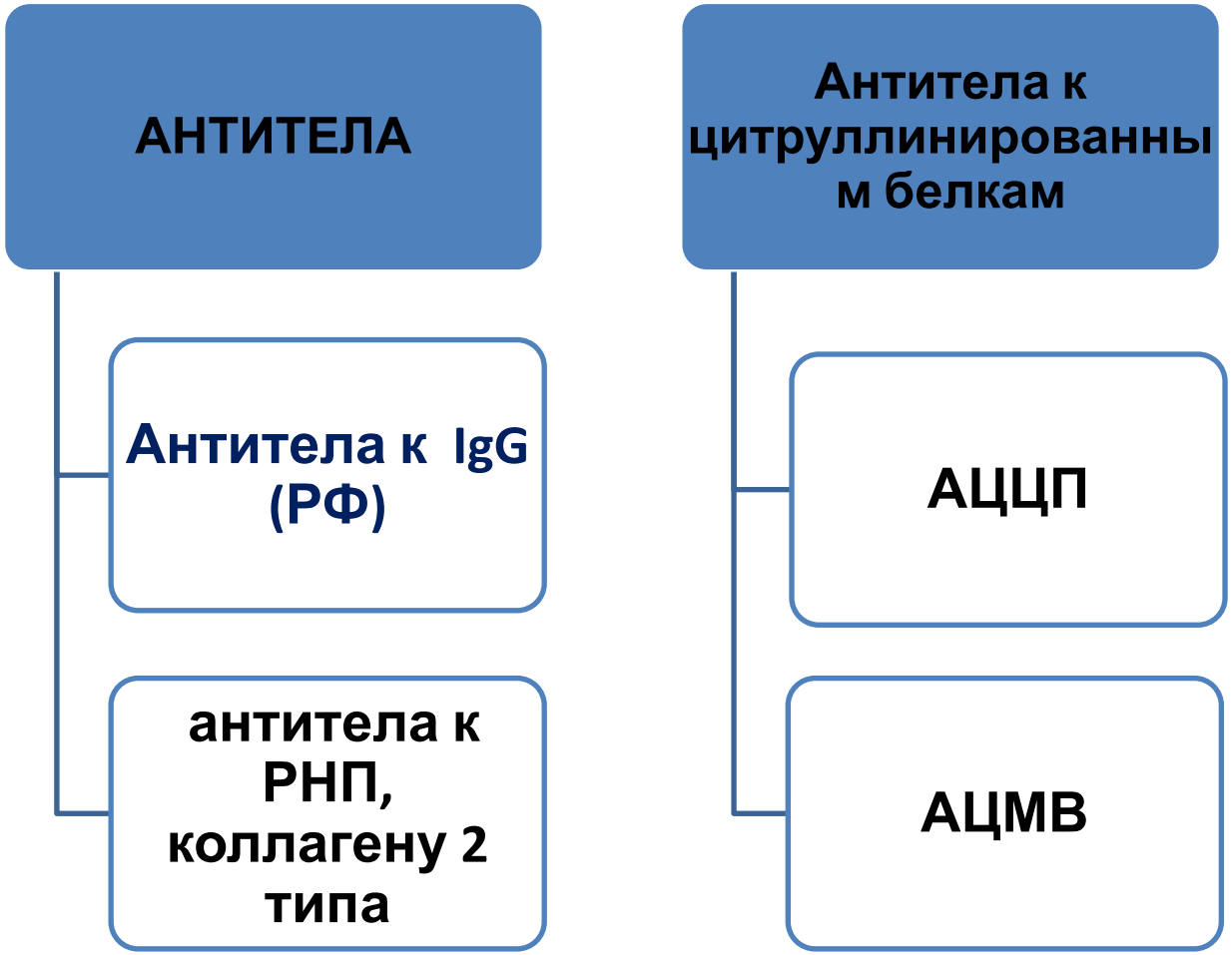
Состояние иммуно-компетентных клеток

- **Изменение количества лимфоцитов**
- **субпопуляций лимфоцитов**
- **функционального состояния иммуно-компетентных клеток** (Т-лимфоциты, макрофаги)
- **рецепторного аппарата ИКК**

Специфические белки, обнаруживаемые в плазме:

- цитруллинированные пептиды
- белок 14-3-3-η –новый маркер РА
- гликопротеин семафорин 4А - ко-стимулятор Т-лимфоцитов

Иммунологические маркеры



Циркулирующие антитела в диагностике РА

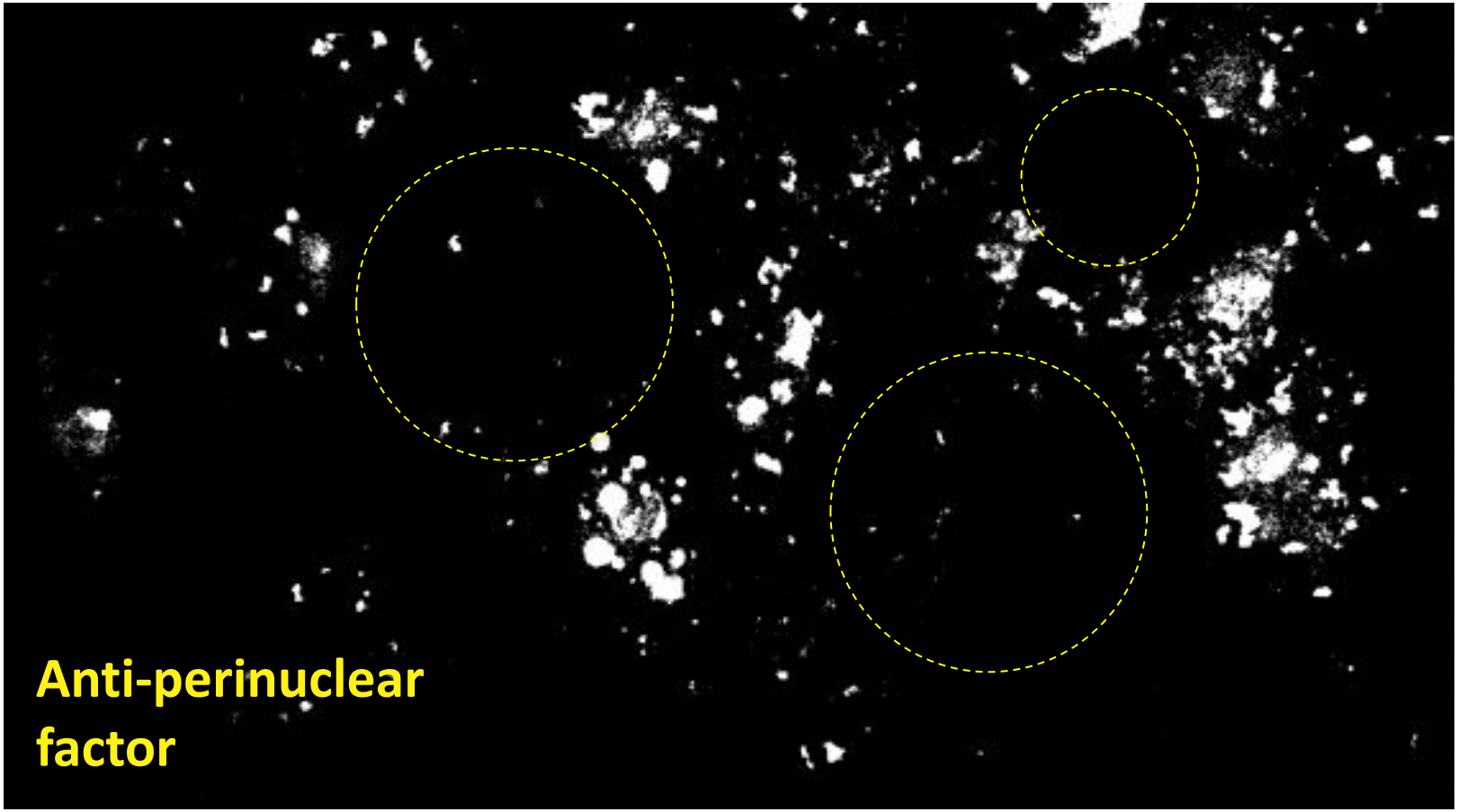
Иммунологические маркеры ревматоидого артрита

Аутоантитело	Автор, год описания	Частота при раннем РА	Специфичность
Ревматоидный фактор	***Waaler, 1940***	**15-30%**	**70%**
Антинуклеарные антитела	*Beck, 1964*	30%	50%
Антитела к RA-33	***Hassfeld et al. 1989***	***25%***	***90%***
Антиперинуклеарный фактор	*Nienhuis et al. 1964*	50%	90%
Антикератиновые антитела	*Young et al. 1979*	40%	95%
Антитела к виментину (Sa)	*Despres N et al 1994*	30%	95%
Антитела к циклическому цитруллиновому пептиду	***Schellekens GA et al. 1998, van Venrooj et al. 2000***	**75%**	**95-98%**
Антитела к модифицированному цитруллиновому виментину	***Bang et al. 2006***	**80-85%**	**85%**
Другие антицитруллиновые антитела (цитруллинированные филаггрин, цитруллинированный		50-80%	Нд

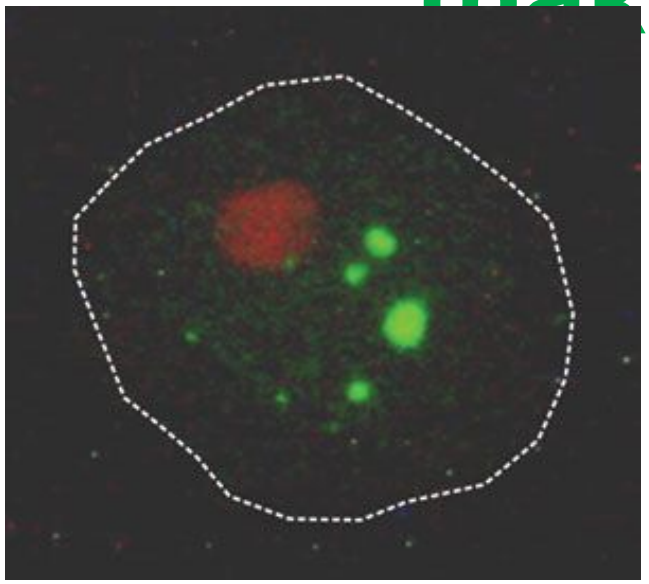
Антитела к модифицированным белкам:

открыты более 50 лет назад как

антиперинуклеарный фактор



Антиперинуклеарный фактор



Staining of granules adjacent to the nucleus in human buccal mucosa epithelium[1]

Окраска гранул, прилежащих к ядру, в эпителиальных клетках слизистой щеки

Waaler–Rose and Latex-fixation tests in 74 APF (+) patients[2]

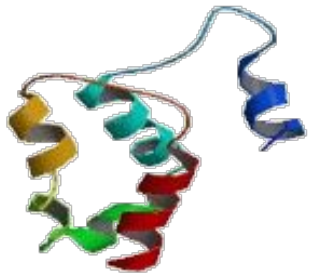
Diagnosis		Waaler–Rose & Latex test		Waaler–Rose test		APF (+)
		(+)	(-)	(+)	(-)	
RA	Definite	48	9	4	4	65
	Probable & possible	6	2	–	–	8
Systemic LE		1	–	–	–	1

APF, anti-perinuclear factor; LE, lupus erythematosus.

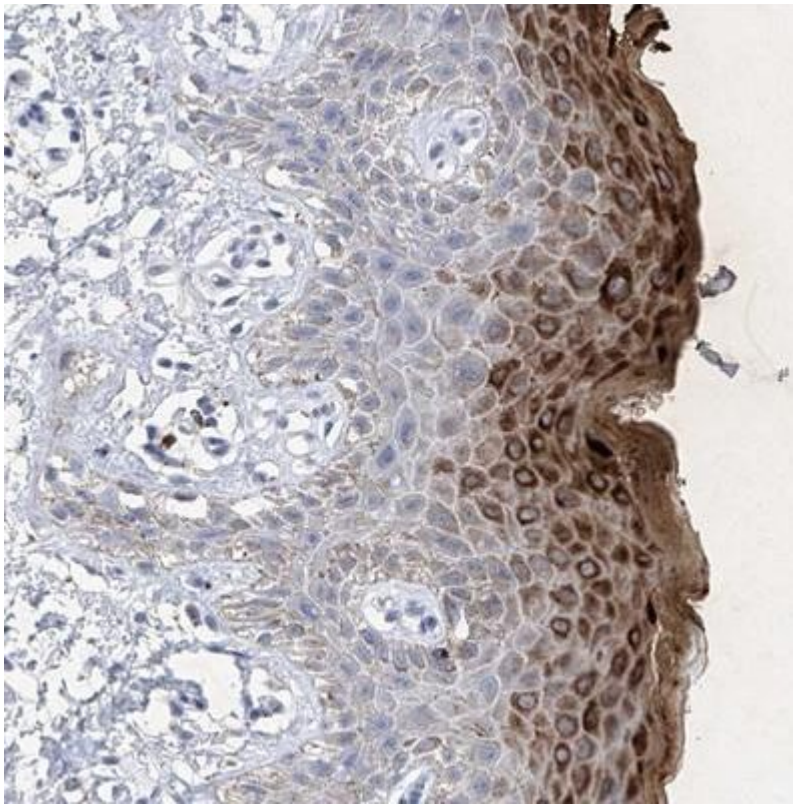
Антикератиновые антитела = антитела к филагрину

- Positive staining of the *Stratum corneum* of rat esophageal epithelium by serum from patients with RA[1]
- Anti-keratin antibodies was a misnomer as the antibodies were not directed against keratin but filaggrin[1]
- The antigen was identified as filaggrin[2]

Filaggrin[4]



Filaggrin Ab staining of human vulva/anal skin shows strong cytoplasmic positivity in superficial layer of squamous epithelium[3]

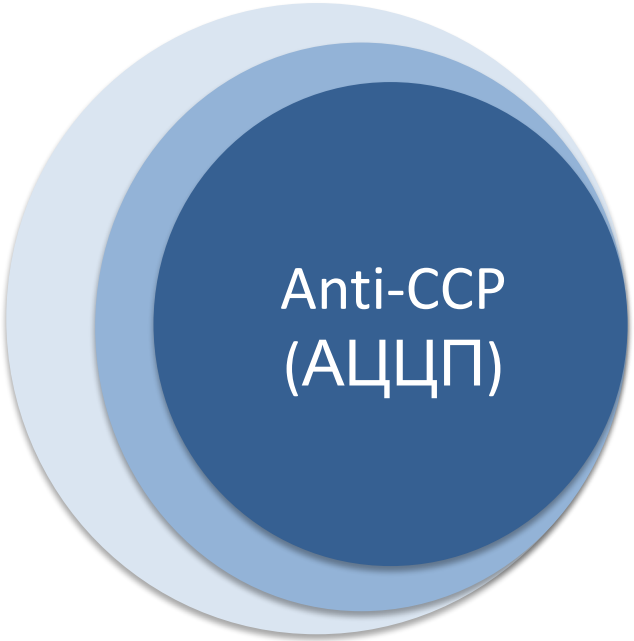


Ab, antibody; RA, rheumatoid arthritis.

http://www.novusbio.com/Filaggrin-Antibody_NBP1-87527.html
http://www.uscnk.com/directory/Filaggrin%28FLG%29-8103.htm

Антитела к цитруллинированным белкам (ACPA) реагируют с разными эпитопами

Filaggrin 48–65
Fibrinogen B 246–267
Fibrinogen
Fibrinogen A 211–230
Fibrinogen A 582–599
Fibrinogen A 556–575
Fibrinogen A 616–635
Vimentin
H2B/a 62–81
H2A/a 1–20
Histones 2A
Histones 2B
Clusterin 221–240
Clusterin 231–250
Biglycan 247–266
Enolase 1A 5–21
Vimentin 58–77
Apolipoprotein E
Apolipoprotein E 277-296

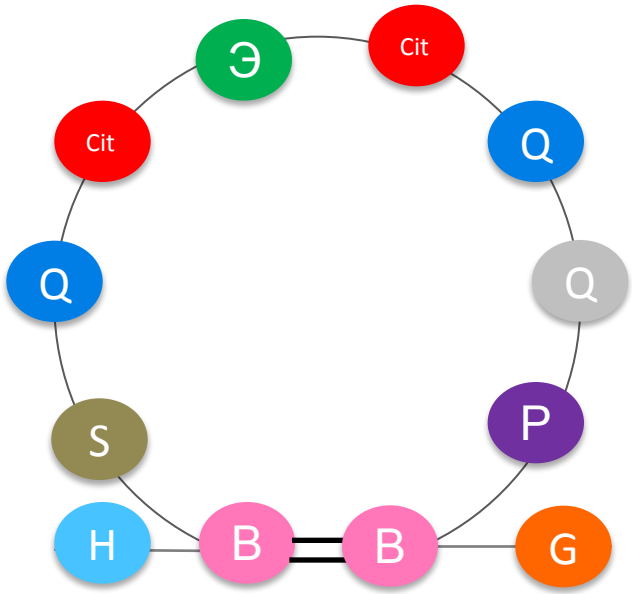


АЦЦП- скрининговый тест, выявляющий антитела к различным цитруллинированным белкам

ACPA, anti-citrullinated protein antibody.

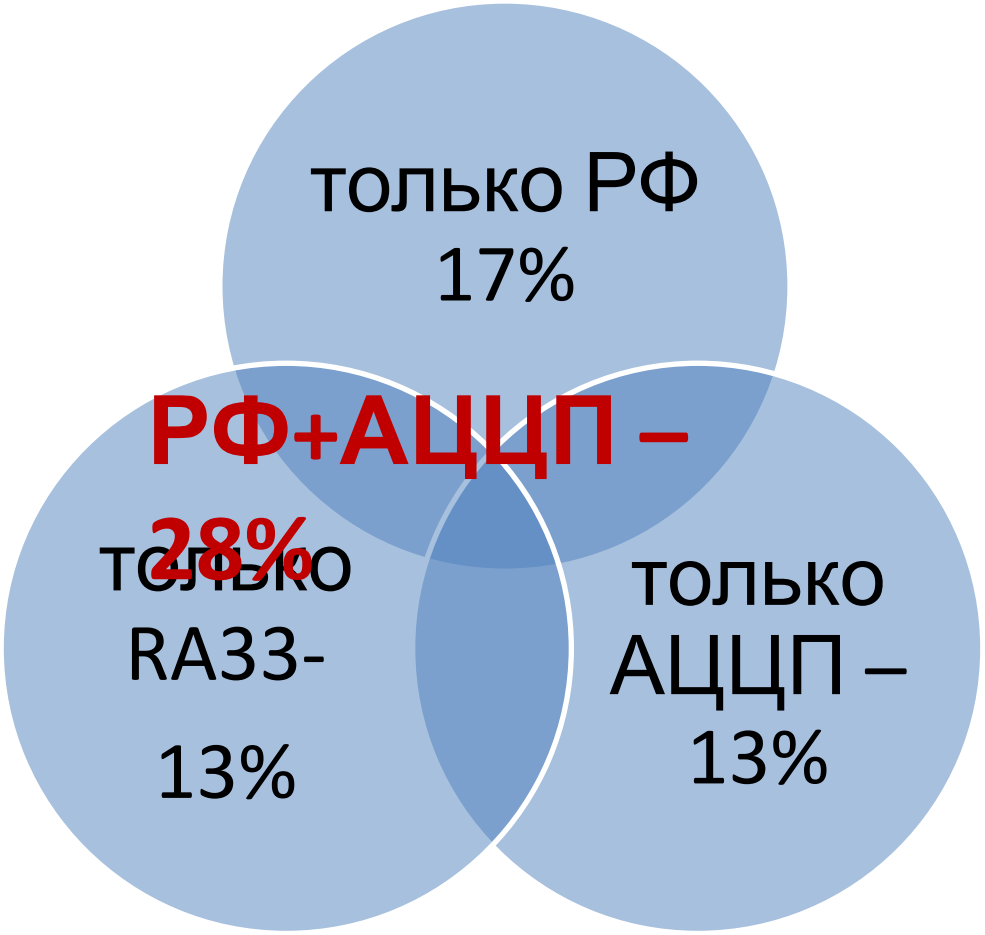
Прогностическая ценность АЦЦП (ACPA) в дебюте РА

- Значительный прогресс в области стандартов диагностических исследований
- АЦП обнаруживаются примерно у 70% пациентов с РА на ранних стадиях заболевания
- У АЦП (+) пациентов отмечаются гораздо более тяжелые структурные повреждения, чем у АЦП (-)

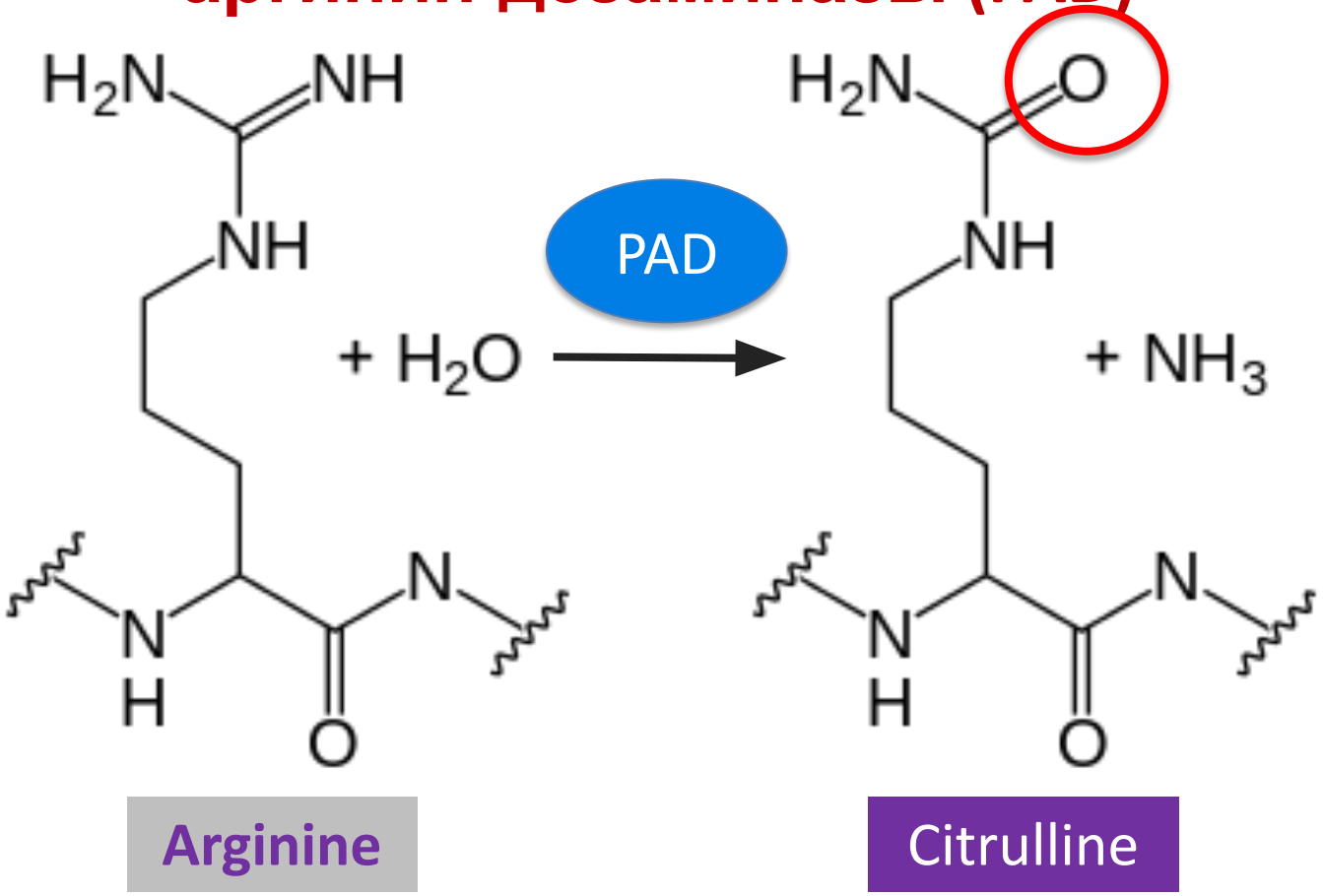


АЦП — антитела к цитруллинированному пептиду; РА — ревматоидный артрит.

Прогностическая значимость иммунологических маркеров в развитии эрозий при раннем РА

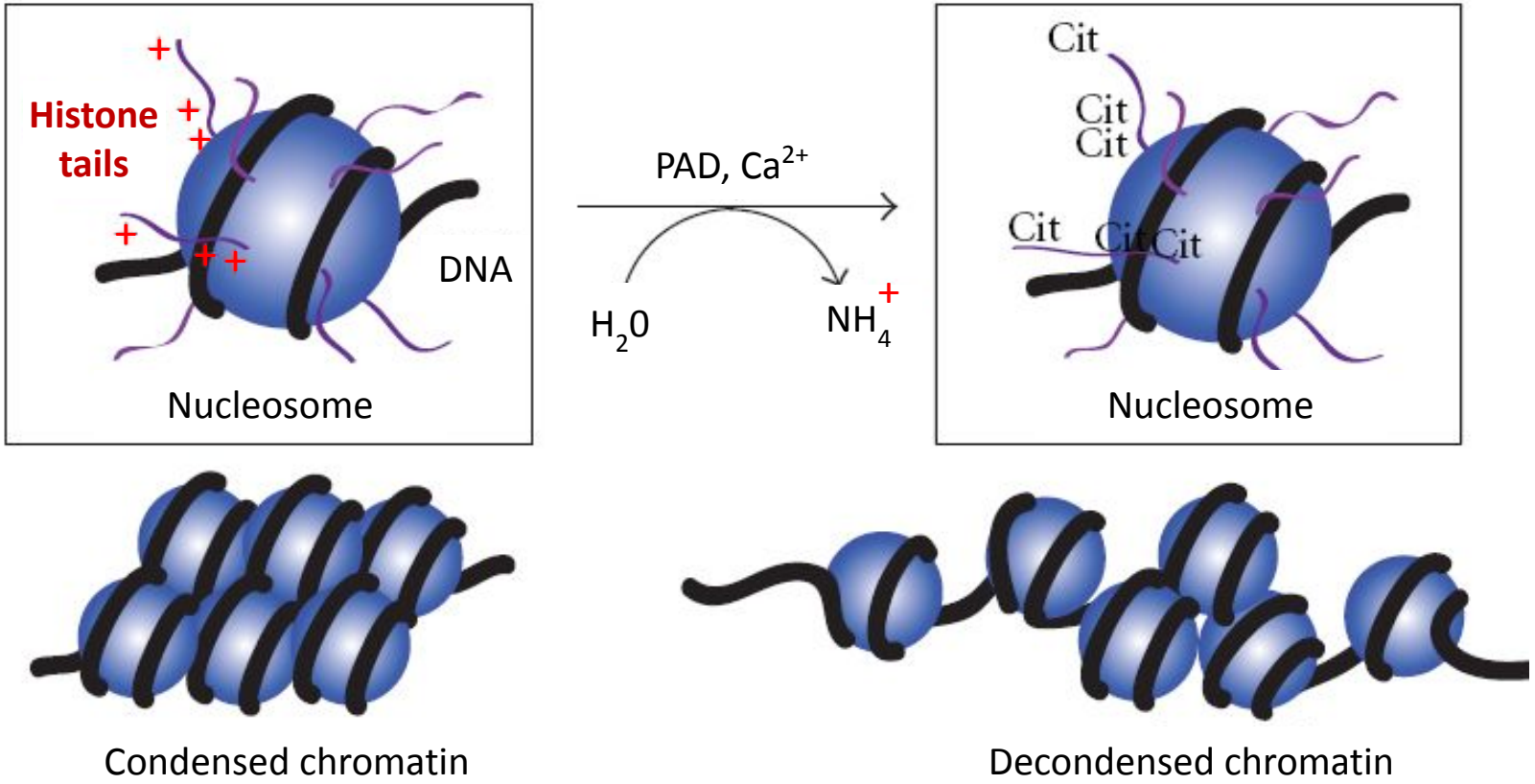


Цитруллинирование – это процесс модификации белка под действием фермента пептидил-аргинин-дезаминазы (PAD)



PAD - peptidyl arginine deiminase.

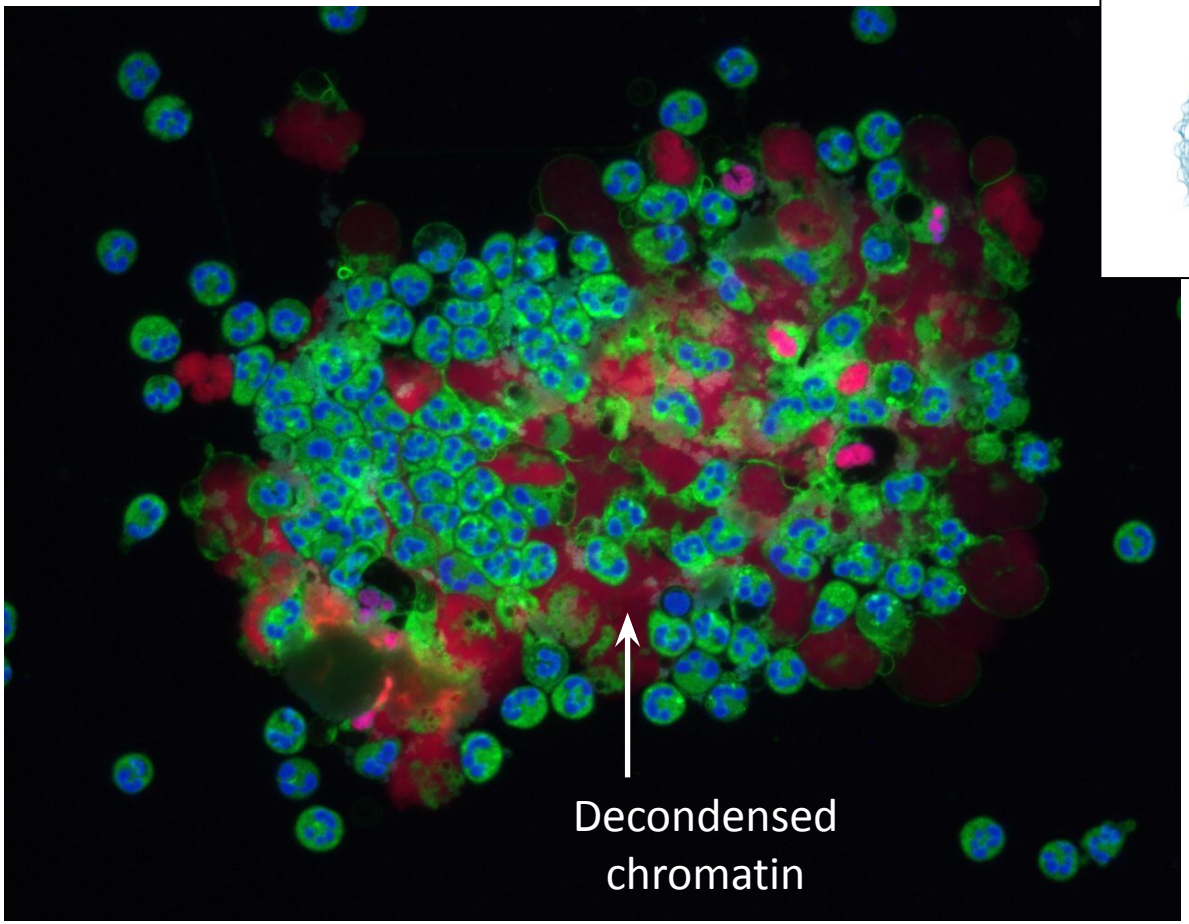
Цитруллинирование гистона H3 способствует деконденсации хроматина

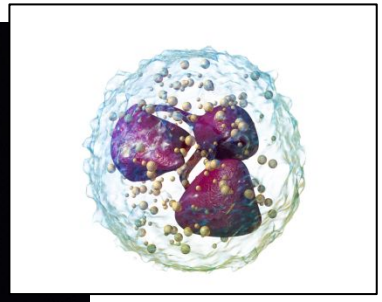


PAD, peptidyl arginine deiminase.

NETosis depends on citrullination and PAD enzymes :

Клеточная смерть зависит от процесса цитруллинирования и активности PAD - энзима



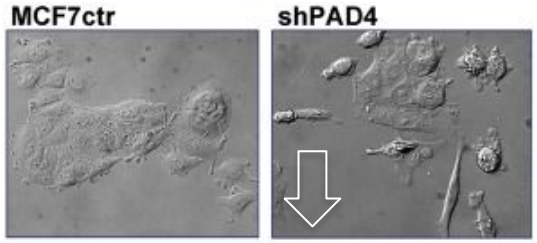


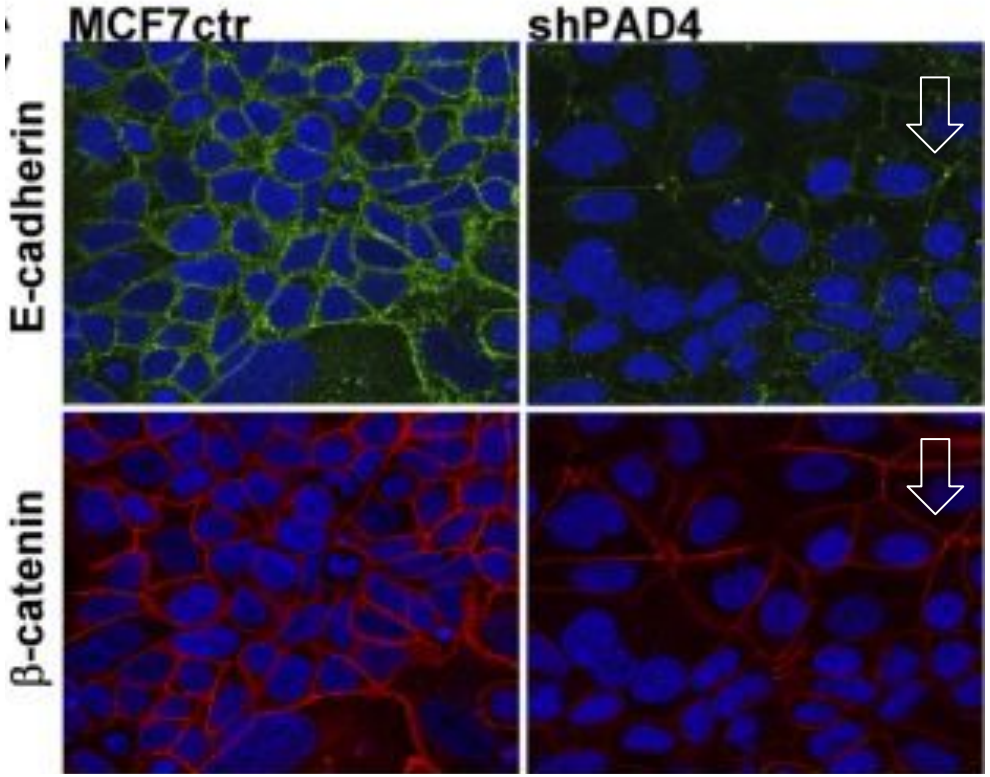
NETosis is the release of NETs during a form of pathogen-induced cell death.
NET, neutrophil extracellular trap. (внеклеточные «ловушки» нейторфилов)

http://www.nacht-der-wissenschaften.de

Цитруллинирование белков при эпителиальном раке (рак кожи, молочной железы)

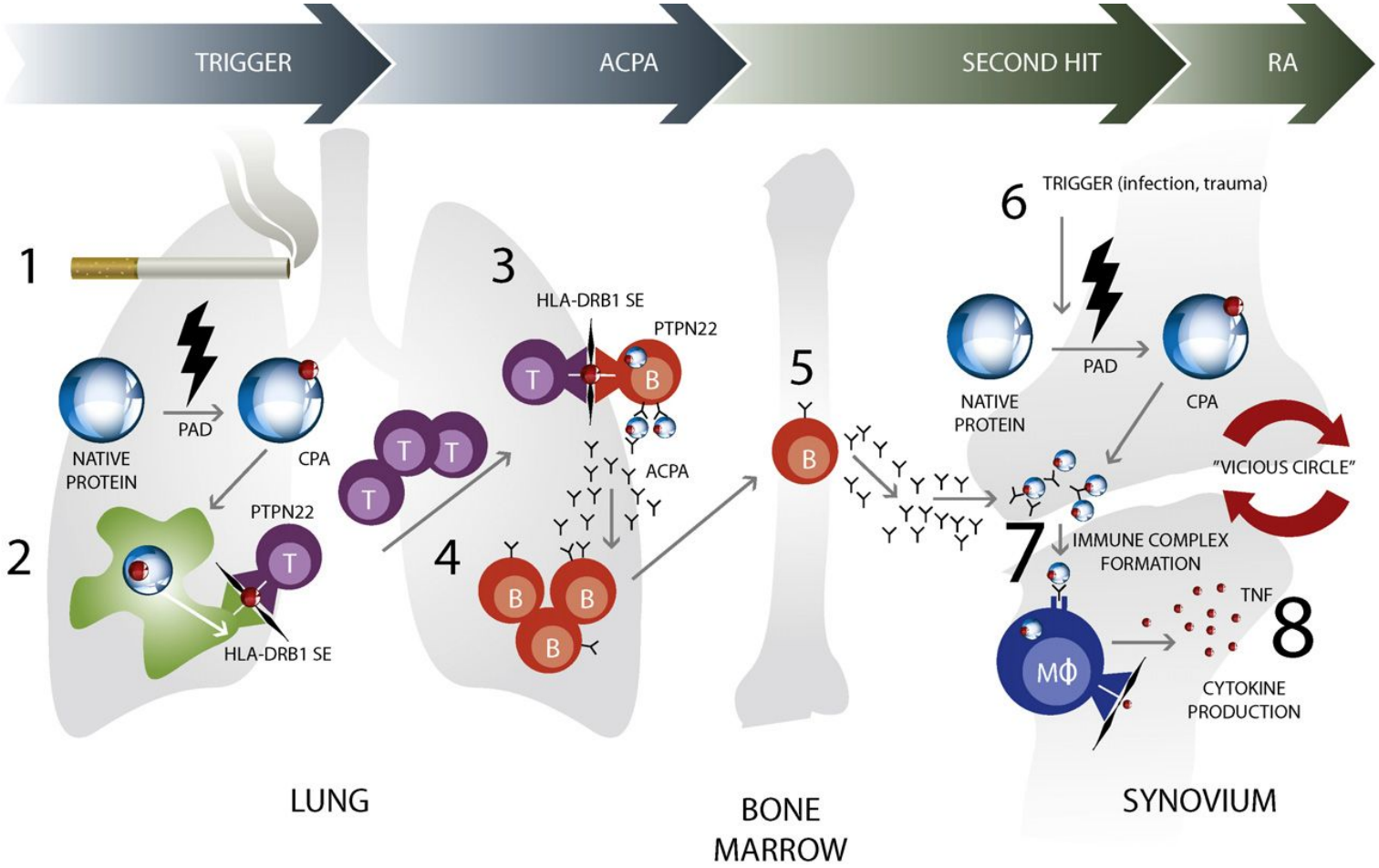
In breast cancer cells reduction of PAD4 expression dissociates tumor cell interactions





ACPA, anti-citrullinated protein antibody; IF PAD, peptidyl arginine deiminase.

Путь от цитруллинирования к образованию ACPA (АЦЦП)



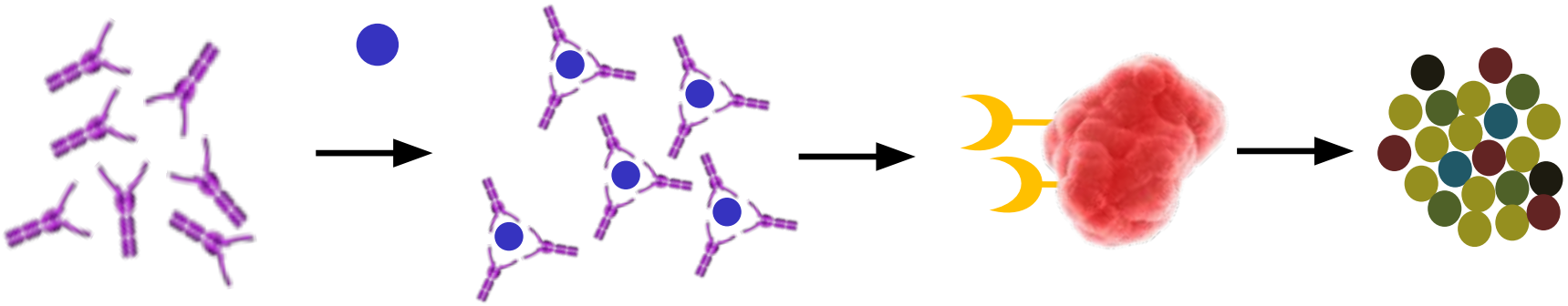
ACPA, anti-citrullinated protein antibody; CCP, cyclic citrullinated peptide; PAD, peptidyl arginine deiminase; RA, rheumatoid arthritis; TNF, tissue necrosis factor.

АЦЦП образуют иммунные комплексы, активирующие макрофаги

Self-antigen (citrullinated protein)

Immune complexes bind to Fc receptor

Macrophage activation and cytokine secretion



ACPA

Immune complexes

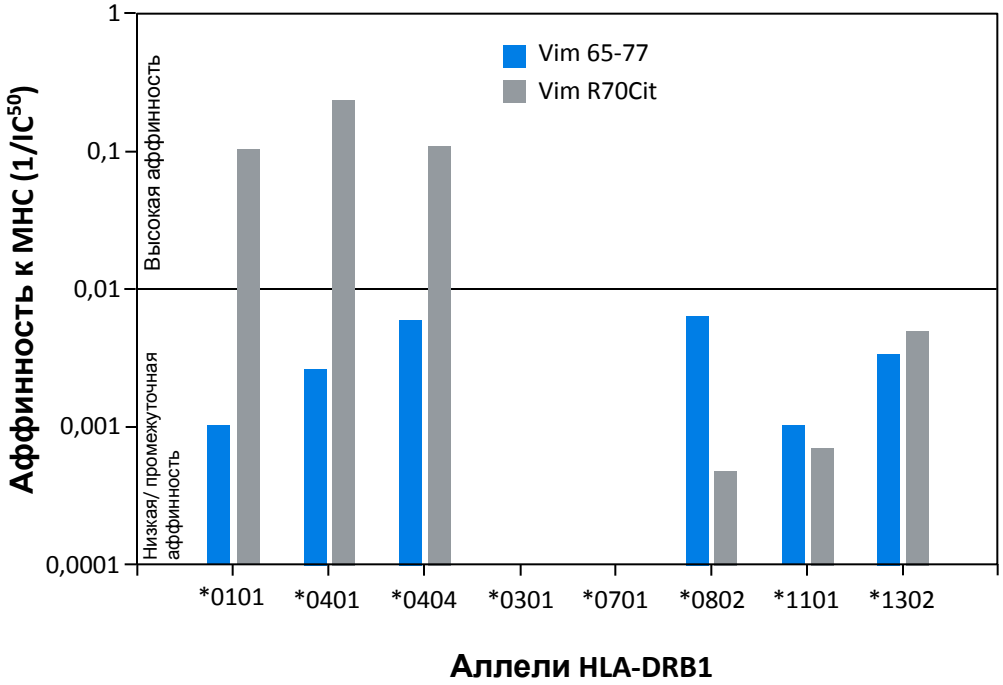
Activated macrophage

Proinflammatory cytokines

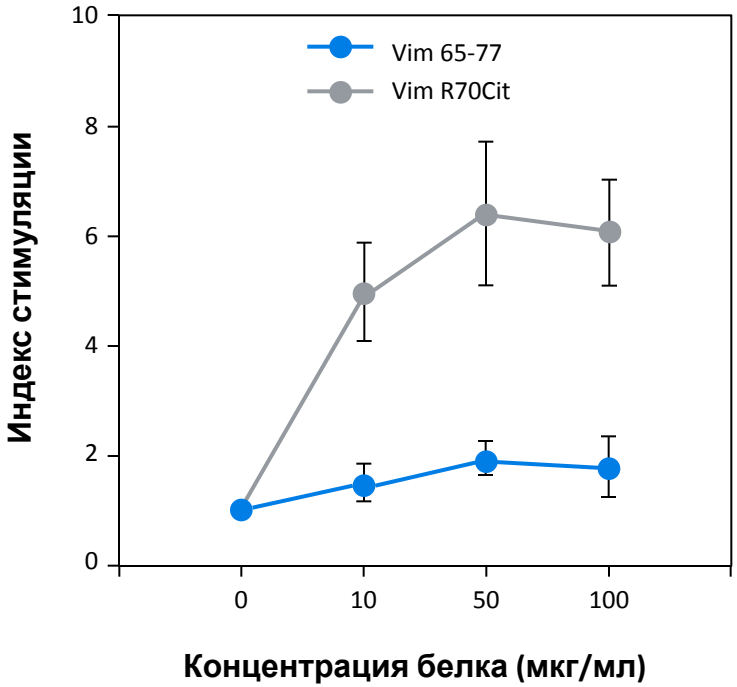
ACPA, anti-citrullinated protein antibody.

Цитруллинирование улучшает связывание белков с некоторыми аллелями HLA класса II и приводит к активации Т-клеток

Сравнительная аффинность Vim 65–77 и Vim R70Cit к молекулам очищенного MHC класса II

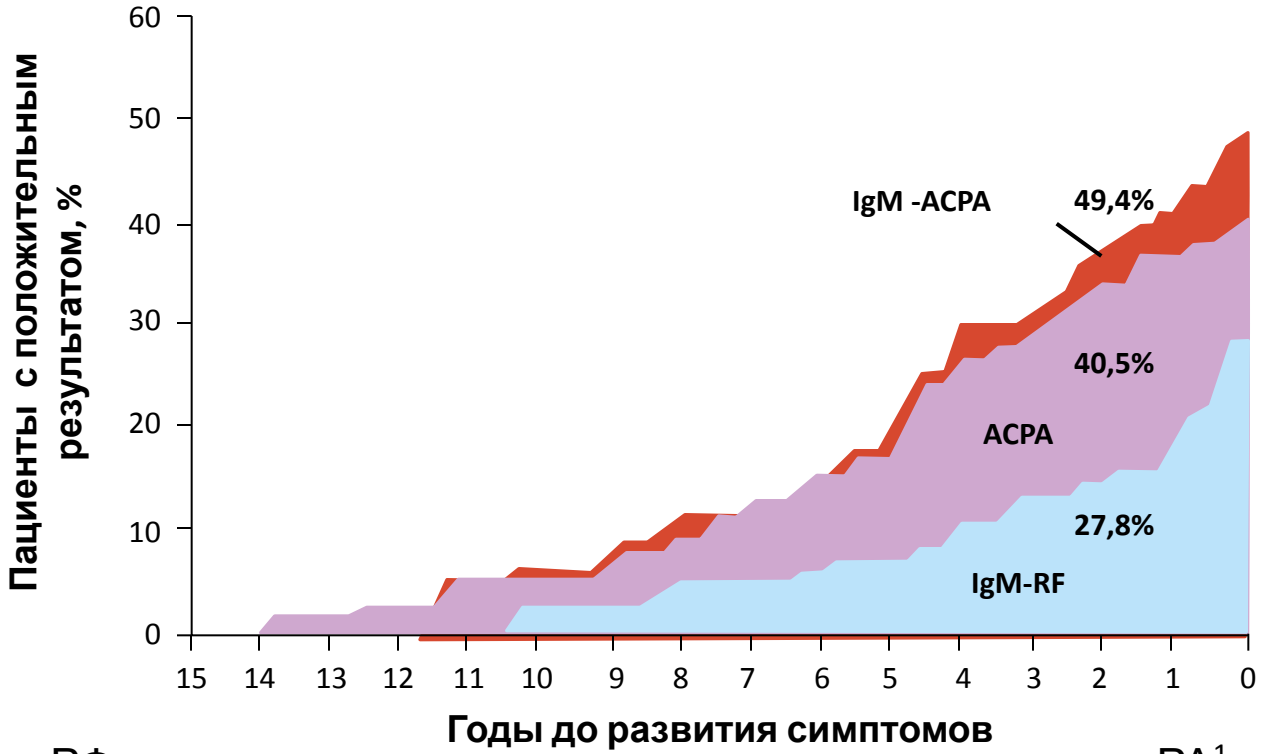


Анализ Т-клеточного иммунного ответа



MHC — главный комплекс гистосовместимости; Vim — виментин; Cit — цитруллин.

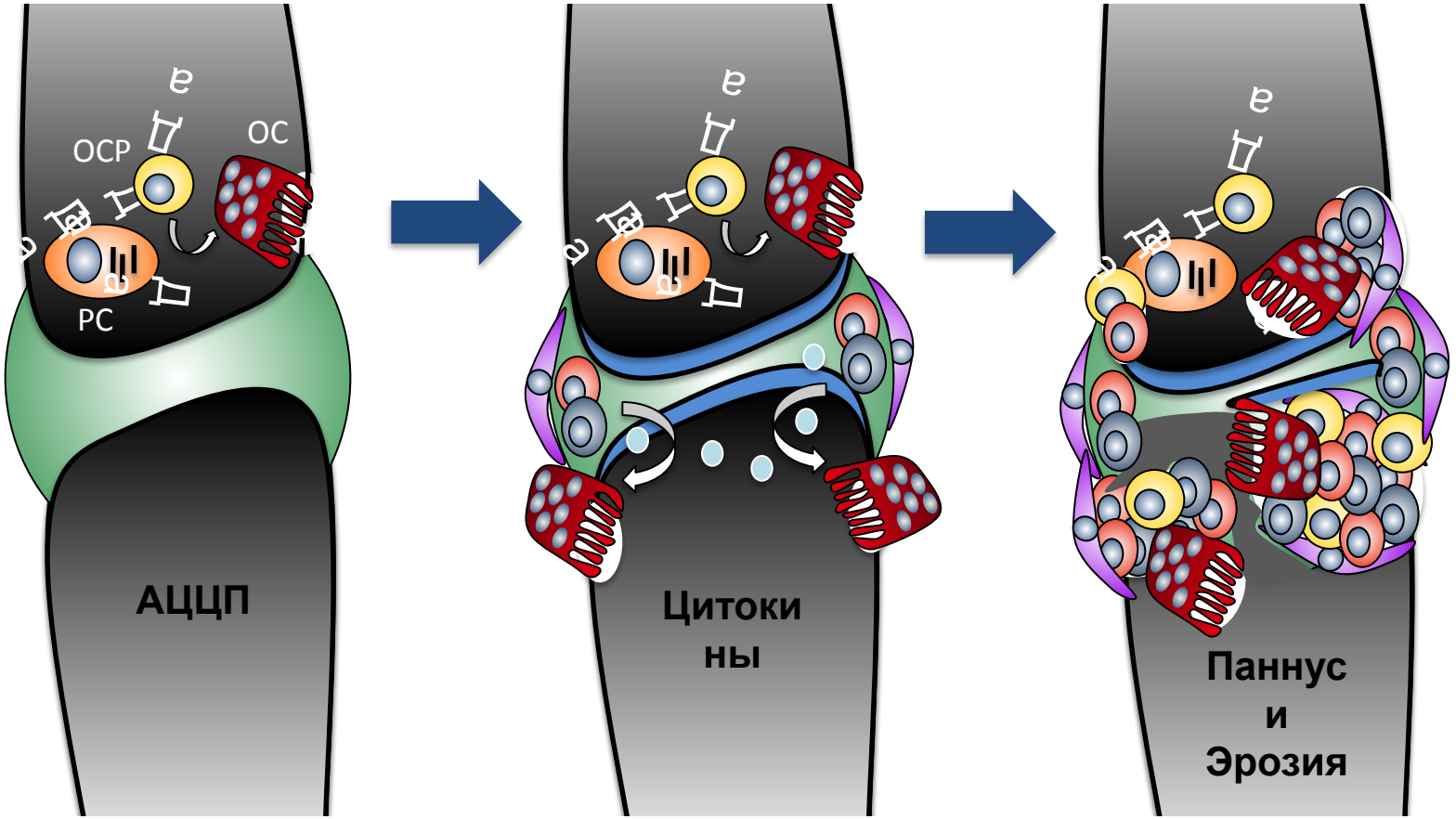
АЦЦП: уровни аутоантител до развития РА



- ACPA и РФ у пациентов появляются за много лет до развития РА[1]
- IgA РФ также появляется у пациентов за годы до развития клинических симптомов [2]

ACPA, антитело к цитрулинированному протеину; Ig, иммуноглобулин; РА, ревматоидный артрит; РФ, ревматоидный фактор.

Модель развития эрозии кости при артрите



Доклиническая фаза

Клиническое развитие

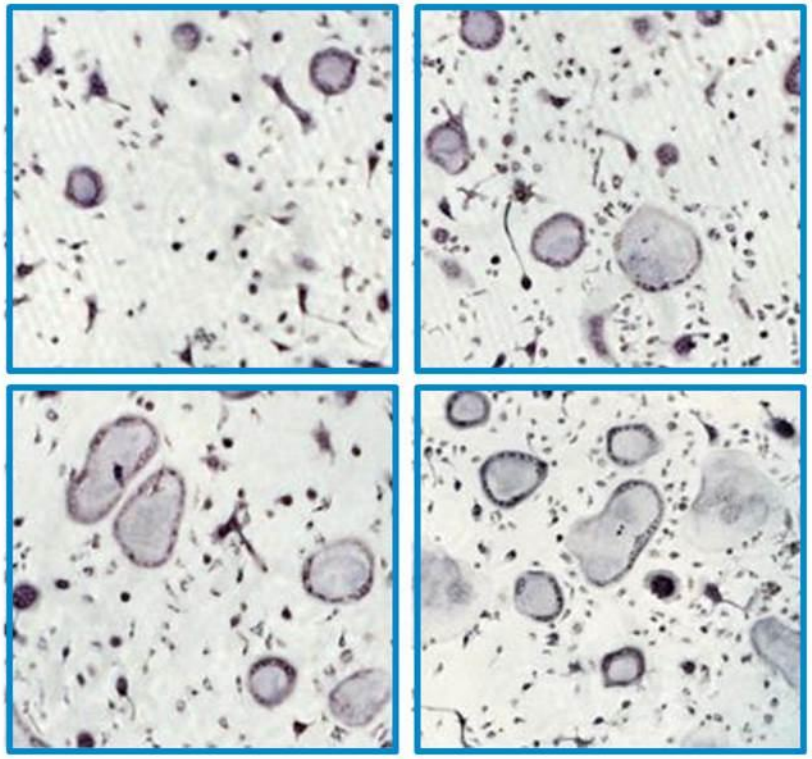
Развившееся заболевание

ACPA, антитело к цитруллинированному протеину.

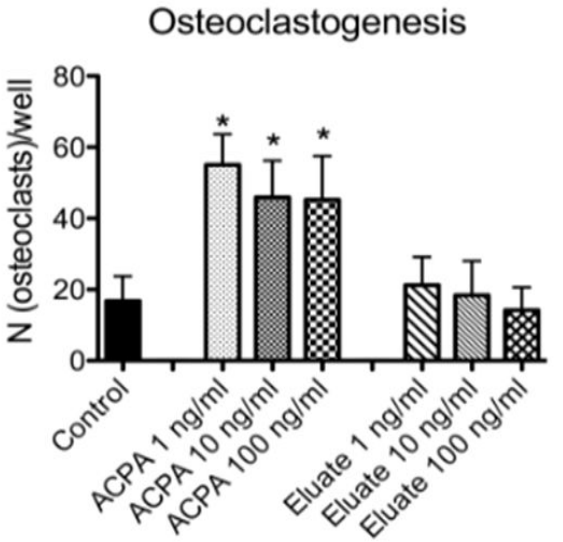
Schett G and Gravallese E. Nat Rev Rheumatol. 2012;8:656-64.

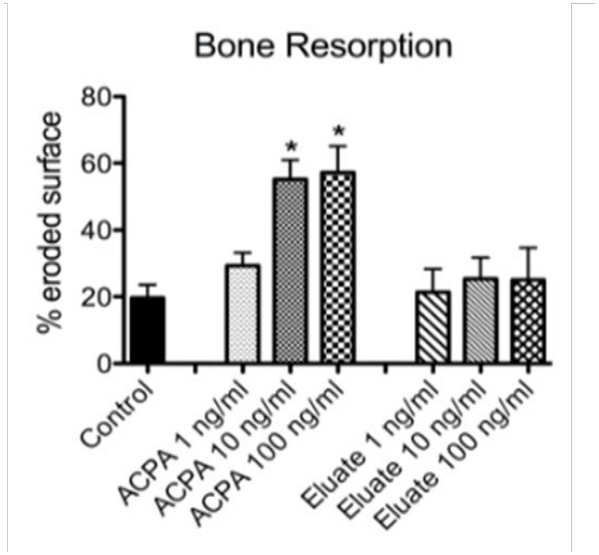
АЦЦП и дифференцировка остеокластов

АСРА 0 нг/мл АСРА 1 нг/мл



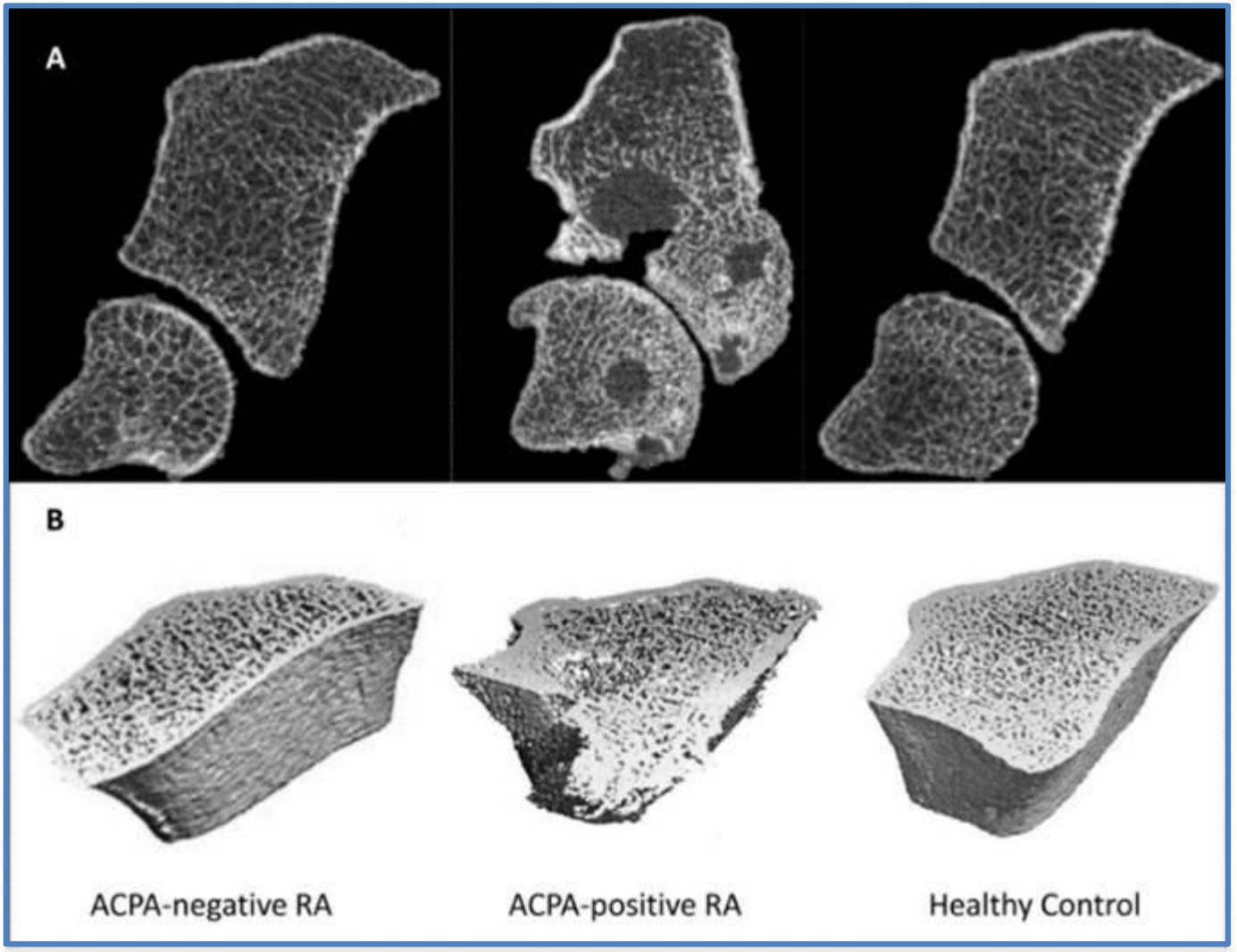
АЦЦП 10 нг/мл АЦЦП 100 нг/мл





Harre U, et al. J Clin Invest. 2012;122:1791-802.

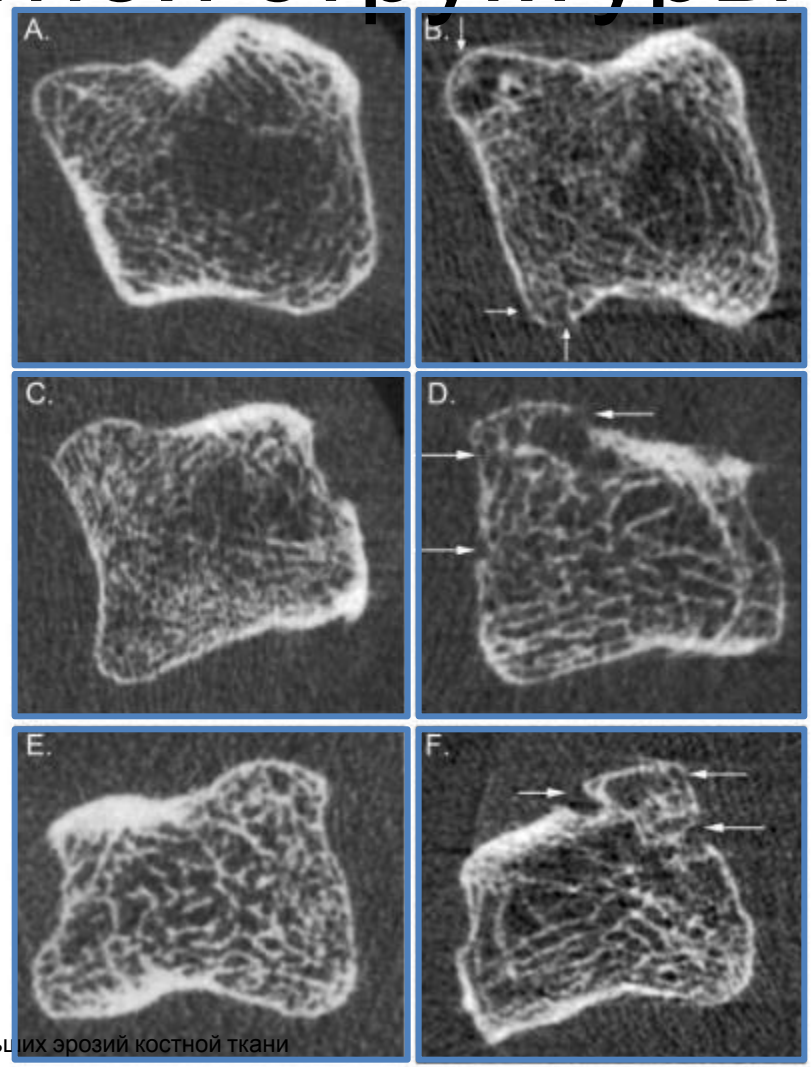
Локальные эрозии костной ткани у АЦЦП+ и АЦЦП- пациентов с РА



Schett G. Arthritis Res Ther. 2007;9:203.

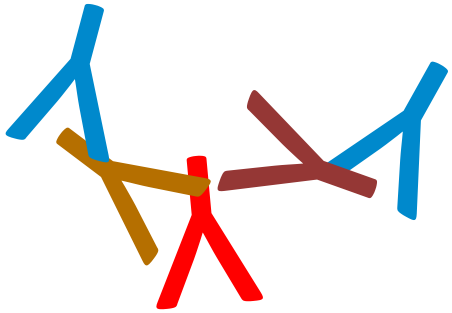
Изменения костной структуры

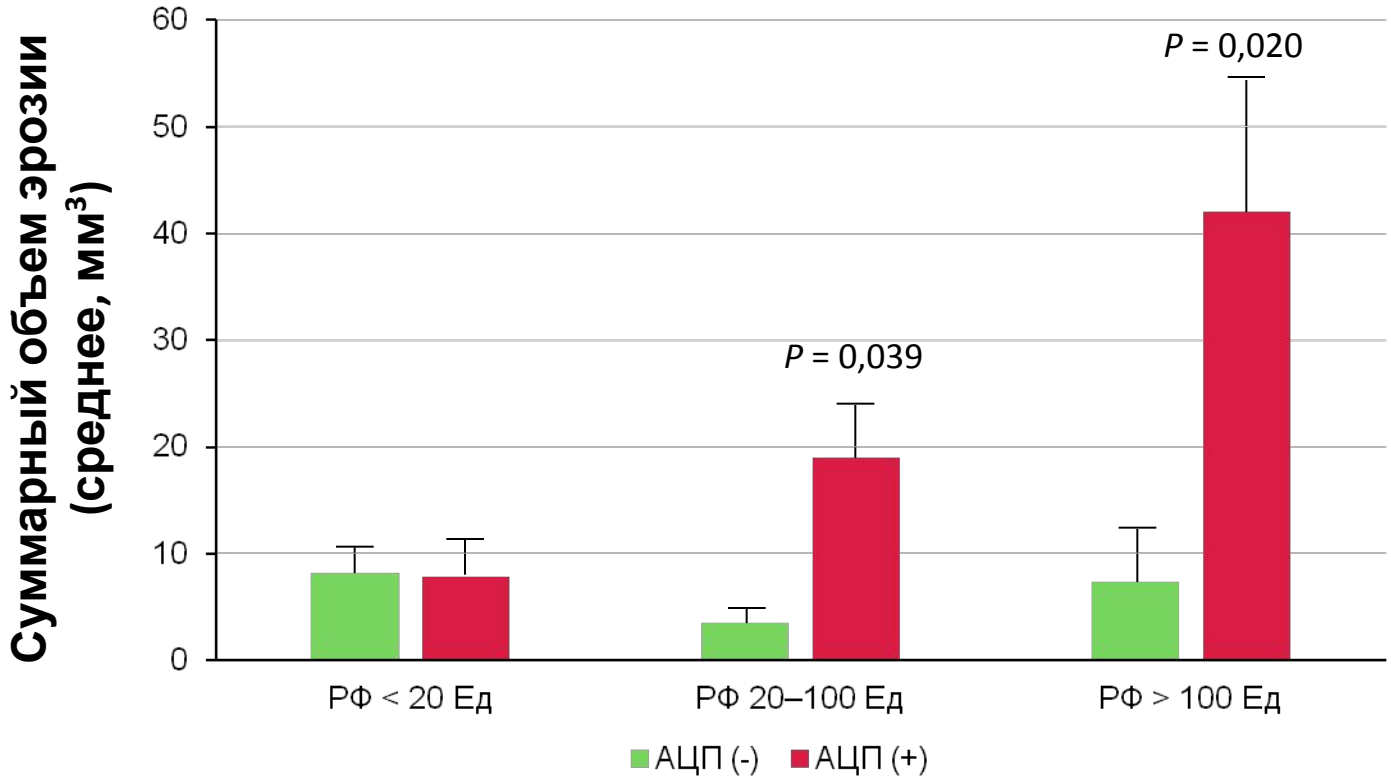
Изменение костной структуры
у АЦП (+) пациентов
без артрита
по сравнению с
контрольными АЦП (-)



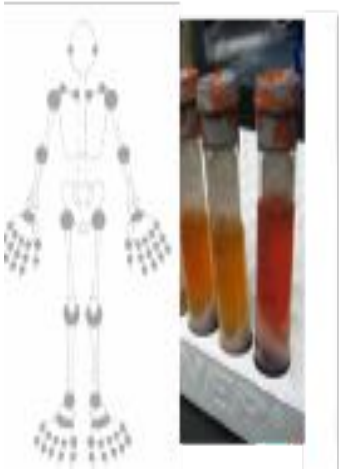
Стрелками указаны участки истончения и фенестрации коркового слоя, а также небольших эрозий костной ткани
АЦП — антитела к цитруллинированному пептиду.

Взаимосвязь между АЦП, РФ и связанной с РА потерей костной ткани





АЦП — антитела к цитруллинированному пептиду; РА — ревматоидный артрит; РФ — ревматоидный фактор.



Клиническое значение АЦЦП

- АЦЦП- высоко-специфичный маркер РА (88-96%)[1]
- АЦЦП позитивность и вызванная АЦЦП потеря костной ткани возникают **до клинического развития РА**
- АЦЦП, особенно в высоких титрах, ассоциируются с прогрессированием заболевания и **развитием эрозий в суставах.**
- РФ ассоциируется с более агрессивным течением заболевания и **системными проявлениями**
- АЦЦП и РФ высоко ассоциируются друг с другом, особенно на ранней стадии РА и стимулируют эрозивный процесс в суставах

Терапия ГИБП рекомендована пациентам при наличии факторов неблагоприятного прогноза:
АЦЦП+, РФ+, высокая активность РА, ранние эрозии в суставах. (EULAR-рекомендации 2013)

6. Coenen D, et al. *Clin Chem* 2007;**53**:498–504;

INVESTIGATIONS

- Autoantibodies are thought to be the major tools of investigating Rheumatological disorders. Beside auto-antibodies ,Medical artoscopy and Musculo-skeletal ultrasound

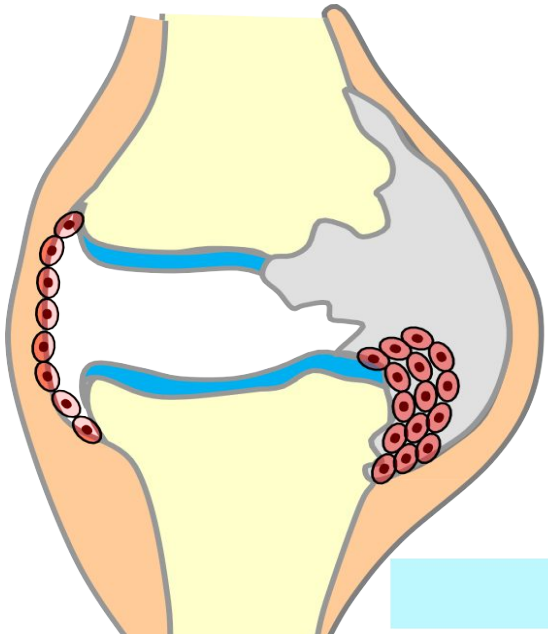
(MSK uSS) in the hands of Rheumatologist are newer developments in the diagnostic techniques.

INVESTIGATIONS

- Medical arthoscopy and MSK ultrasound both have been proved to be important diagnostic tolls in the hands of Rheumatologist
- Arthroscopy is an accurate, reliable method for examining the interior structure of joints while there are very few Rheumatologists who are using the technique. The decision to learn arthroscopy is thus individual based..

Synovium is the primary site of inflammation in RA

- It has become clear in recent past that the synovium is the primary site of inflammation & a major effector organ in a variety of joint diseases including Rheumatoid Arthritis (RA) as a result there had been increased interest in studies of pathological changes of the synovium.



ARTHROSCOPY

- ***Indications***
- 1. when a thorough history, physical examination & suitable non invasive & radiographic studies have failed to establish a diagnosis.
- When treatment of a specific problem has failed and there is need for additional information that other studies cannot provide.
- When specific additional diagnostic information can be ob- tained in a less traumatic way (biopsy).
- ***Contraindications***
- A minimally deranged patient that will respond to the usual method of treatment.
- Local skin infections.

  Partial or complete ankylosis – difficult maneuverability of
- instruments.

Pathologic Findings in Arthritis

Rheumatoid synovial villi are larger than normal, club shaped, pale, edematous, and numerous;

in the knee they proliferate in the suprapatellar roof, along the edges of the femoral condyles, beneath the menisci, and in the intecondylar notch.

Early, the creeping pannus can be pulled from articular edges with a probe, demonstrating the erosion of underlying hyaline cartilage.

Later stages may show extensive fibrillation, ulcers, or craters, often in an irregular, pattern over the femoral condyles and patellofemoral goove.

The joint often contains thick, yellowish synovial fluid with numerous, small, opaque white fragments, so-called rice bodies.

ULTRASOUND IN RHEUMATOLOGY PRACTICE

- conventional Radiography has long been the mainstay of the radiological assessment of joint disorders. however, early periarticular soft tissue abnormalities and synovitis are also not very well seen by X-rays. Although the gold standard for the assessment of soft tissue abnormalities is MRI, in the last few years, musculoskeletal uSG has made its niche as an important radiological investigation in the initial assessment of rheumatoid disease and during follow-up. This has been possible due to the availability of better uSG equipment, higher frequency transducers and state-of-the-art software.

ULTRASOUND IN RHEUMATOLOGY PRACTICE

- **INDICATIONS**
- Early detection of erosive disease
- Assessment of synovial tissue
- Assessment of effusions
- Detection of enthesitis in seronegative spondyloarthritis
- Assessment of treatment response
- Assessment of crystal arthropathy
-