

Przeciwciała przeciwko nukleosomom – nowy marker nefropatii toczniowej

Antinucleosome antibodies – a new marker of lupus nephropathy

Agnieszka Szewczyk, Wiesław Gliński

Klinika Dermatologiczna Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: prof. dr hab. med. Wiesław Gliński

Przegl Dermatol 2012, 99 681–691

SŁOWA KLUCZOWE:
nukleosom, SLE, nefropatia toczniowa, *lupus nephritis*.

KEY WORDS:
nucleosome, SLE, lupus nephropathy, *lupus nephritis*.

ADRES DO KORESPONDENCJI:
dr n. med.
Agnieszka Szewczyk
Klinika Dermatologiczna
Warszawski Uniwersytet
Medyczny
ul. Koszykowa 82 A
02-008 Warszawa
e-mail: aszewczy@mp.pl

STRESZCZENIE

Wprowadzenie. W ostatnich latach pojawiły się doniesienia o dużym znaczeniu diagnostycznym i prognostycznym przeciwciał przeciwko nukleosomom u chorych na toczeń rumieniowaty układowy (ang. *systemic lupus erythematosus* – SLE). Nukleosom jest jednostką składową chromatyny, zbudowaną z histonów H1, H2A, H2B, H3, H4, które oplatają nić DNA. Nukleosomy uwalniane są w procesie apoptozy komórek.

Cel pracy. Ocena częstości występowania przeciwciał przeciwko nukleosomom w SLE oraz ich związku ze zmianami w nerkach i aktywnością choroby w skali SLAM.

Materiał i metodyka. Badaniem objęto 52 pacjentów z SLE, u których metodą immunofluorescencji pośredniej (ang. *indirect immunofluorescence* – IIF) na komórkach Hep-2 stwierdzono przeciwciała przeciwdrożdżowe. Do wykrycia przeciwciał przeciwko dsDNA użyto testu IIF na komórkach *Crithidia luciliae*. W celu identyfikacji przeciwciał zastosowano test immunodyfuzji oraz immunoblotu EUROLINE (Euroimmun Medizinische Labordiagnostika Lubeck, Niemcy). Grupę kontrolną stanowiło 50 pacjentów z twardziną układową.

Wyniki. Wśród chorych na SLE przeciwciała przeciwko nukleosomom stwierdzono u 20 (38%), natomiast wśród pacjentów z twardziną układową u 1 (2%). Analiza statystyczna porównująca grupę pacjentów z obecnymi przeciwciałami przeciwko nukleosomom z grupą osób bez tych przeciwciał nie wykazała związku ich występowania z płcią pacjentów, ich wiekiem, wiekiem w chwili początku choroby oraz czasem trwania choroby w momencie badania. Miana ANA w surowicach chorych bez przeciwciał nukleosomowych były istotnie statystycznie niższe od mian przeciwciał przeciwdrożdżowych, w których stwierdzono przeciwciała przeciwko nukleosomom ($p = 0,0119$). Przeciwciała przeciwko dsDNA u pacjentów z przeciwciałami przeciwnukleosomowymi występowały statystycznie częściej w porównaniu z grupą osób, u których nie wykryto przeciwciał nukleosomowych ($p < 0,001$). W 55% przypadków z przeciwciałami przeciwko nukleosomom stwierdzono patologię w obrębie nerek objawiającą się zmiennym białkomoczem powyżej 0,5 g/dobę i/lub nefropatią potwierdzoną biopsją nerki. U 30% pacjentów z przeciwciałami przeciwko nukleosomom białkomocz wynosił poniżej 0,5 g/dobę, a u 15% nie stwierdzono zmian nerkowych. Analiza statystyczna wykazała, że nerki były zajęte istotnie statystycznie częściej u pacjentów z obecnymi przeciwciałami przeciw-

ko nukleosomom (odpowiednio $p = 0,0025$ i $p = 0,0024$), a także u chorych z przeciwciałami przeciwko dsDNA. Aktywność choroby oceniana w skali SLAM była większa u pacjentów z przeciwciałami przeciwko nukleosomom (mediana 11) niż u pacjentów bez tych przeciwciał (mediana 7,5). W analizie statystycznej z użyciem testu Wilcoxa nie wykazano istotności statystycznej, choć przy wyniku $p = 0,0648$ można stwierdzić wyraźną tendencję do występowania zwiększonych wartości tej skali u pacjentów z dodatnimi przeciwciałami przeciwko nukleosomom.

Wnioski: Przeprowadzone badania wskazują, że przeciwciała przeciwko nukleosomom mogą być wartościowym markerem immunologicznym w diagnostyce SLE i wykazują związek z nefropatią toczniową.

ABSTRACT

Introduction. In recent years some reports on the diagnostic and prognostic value of antinucleosome antibodies in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) have been published. Nucleosome is a component of chromatin consisting of histones H1, H2A, H2B, H3 and H4 with a stretch of DNA wrapped around. Nucleosomes are released in the process of cell apoptosis.

Objective. To evaluate the frequency of antinucleosome antibodies in SLE patients and its correlation with renal involvement and disease activity assessed by SLAM score.

Material and methods. The material comprised 52 patients with SLE positive for antinuclear antibodies in indirect immunofluorescence (IIF) test on Hep2 cells. Anti-dsDNA antibodies were detected by IIF test using *Crithidia luciliae* as an antigen substrate. Detection of antinucleosome antibodies and identification of specificity of ANAs were performed using the EUROLINE test (Euroimmun Medizinische Labordiagnostika Lubeck, Germany). Sera from 50 patients with systemic scleroderma were also tested as a control group.

Results. Antinucleosome antibodies were found in 20 out of 52 (38%) sera of patients with SLE and in 1 out of 50 (2%) sera of patients with systemic scleroderma. Statistical analysis showed no significant difference between patients with or without antinucleosome antibodies regardless of sex, age, age in the initial phase of the disease and its duration. Antinucleosome antibodies were detected in sera with high titers (320-5120) of antinuclear antibodies. ANA titers in patients without antinucleosome antibodies were significantly lower ($p = 0.0119$). Anti-dsDNA antibodies coexisted, statistically, more frequently with antinucleosome antibodies in comparison with the group without antinucleosome antibodies ($p < 0.001$). In 55% of patients with antinucleosome antibodies pathological changes within the kidneys were observed with a typical proteinuria > 0.5 g/day and/or nephropathy confirmed by renal biopsy. In 30% of patients with antinucleosome antibodies proteinuria below 0.5 g/day was found while 15% of patients had no renal changes. A statistical analysis showed that the renal pathology was more often found in cases positive for antinucleosome antibodies ($p = 0.0025$ and $p = 0.0024$ respectively) and also in patients with anti-dsDNA antibodies ($p = 0.0065$). The activity of SLE according to the SLAM scale was higher in patients with antinucleosome antibodies (median 11) than in those without the antibodies (median 7.5). Wilcoxon's test did not reveal statistical significance, but the result of $p = 0.0648$ implies a distinct tendency for higher values of the SLAM scale among patients with anti-nucleosome antibodies.

Conclusions. Our results suggest that anti-nucleosome antibodies might be a valuable immunological diagnostic marker in SLE, especially of lupus nephropathy.

WPROWADZENIE

Toczeń rumieniowaty układowy (ang. *systemic lupus erythematosus* – SLE) jest ciężką chorobą autoimmunologiczną dotyczącą skóry i narządów wewnętrznych i obejmującą szerokie spektrum objawów klinicznych. Objawy te cechują się zmienną progresją oraz różną reakcją na zastosowane leczenie. Przebieg choroby jest zwykle przewlekły i postępujący z naprzemiennie występującymi okresami zaostrzeń i remisji.

Zmiany nerkowe (*lupus nephritis*) są jednymi z najczęstszych objawów SLE i według piśmiennictwa występują u 25–80% chorych, natomiast we wczesnym okresie choroby stwierdza się je u 25–50% pacjentów [1]. Wczesne zajęcie nerek jest jednym z najważniejszych czynników pogarszających rokowanie. Pacjentów z *lupus nephritis* cechuje podwyższone ryzyko postępującego uszkodzenia funkcji nerek, a także zwiększonej śmiertelności [2]. W ciągu 10 lat od początku choroby u 25% pacjentów występuje schyłkowa niewydolność nerek. U około 5% pacjentów zajęcie nerek obserwuje się późno, często po wielu latach trwania choroby i nierzadko wiąże się ono z występowaniem zespołu Sjögrena. Jeśli zajęte są płuca lub pacjent ma zespół antyfosfolipidowy (ang. *antiphospholipid syndrome* – APS), należy się spodziewać, że proces chorobowy obejmie nerki w ciągu 5 lat [3]. Toczeniowe zapalenie nerek częściej dotyczy dzieci i młodzieży niż osób dorosłych oraz częściej występuje u Latynosów i Afroamerykanów niż u osób rasy kaukaskiej [4]. Najczęstszym objawem klinicznym, występującym u 100% chorych na *lupus nephritis*, jest białkomocz, w wyniku którego u około 45–65% pacjentów rozwija się zespół nerczycowy. U 80% chorych w badaniu ogólnym moczu stwierdza się krwinkomocz mikroskopowy, u 30% w osadzie moczu obecne są wałeczki ziarniste, a u 10% są to wałeczki z krwinek czerwonych. Dość częstym objawem, obserwowanym u 15–50% chorych z nefropatią toczniową, jest nadciśnienie tętnicze [4]. Zmiany patologiczne mogą obejmować cały miąższ nerki, ale najważniejsze z punktu widzenia klinicznego jest zajęcie kłębuszków nerkowych, a rodzaj zmian patologicznych zależy od miejsca odkładania się kompleksów immunologicznych. U chorych na SLE występują trzy główne rodzaje uszkodzenia kłębuszków nerkowych [5]:

- 1) mezangialne rozplemowe kłębuszkowe zapalenie nerek z rozplemem komórek mezangium i przybytkiem macierzy pozakomórkowej; w badaniu immunopatologicznym w mezangium obecne są złożone IgG, IgA i IgM oraz składowych dopełniacza C3, C4 i C1q;
- 2) nefropatia błoniasta – złożone IgG i składowych dopełniacza lokalizują się po nabłonkowej stronie

błony podstawnej kłębuszka; widoczne są pogrubienia błon podstawnych pętli włóściwkowych, a tworzące się wypustki błony podstawnej między złożami opisywane są jako „kolce”; złożone IgG i składowych dopełniacza układają się wzdłuż błony podstawnej kłębuszków, która po uszkodzeniu staje się przepuszczalna dla białek i dochodzi do rozwoju zespołu nerczycowego;

- 3) wewnątrz-kłębuszkowe zapalenie nerek – złożone gromadzą się pod śródbłonkiem i w mezangium kłębuszka; na skutek uszkodzenia komórek śródbłonka dochodzi do ich obrzęku i rozplemu, a wtórnie do rozplemu komórek mezangium, rozpoczyna się kaskada zapalenia – przyciąganie granulocytów obojętnochłonnych, monocytów, makrofagów i innych komórek, które uszkodzają nerkę, powodują powstawanie ognisk martwicy i tworzenie tzw. półksiężyców.

Na podstawie wyników badań bioptatów nerek uznano, że powstawanie półksiężyców następuje w wyniku zmian martwiczych, niezależnie od ich patogeny, oraz że są one niekorzystnym czynnikiem rokowniczym i wiążą się z niepowodzeniami leczniczymi [6].

Uszkodzenie poszczególnych elementów kłębuszka prowadzi do białkomoczu, krwinkomoczu, a następnie do upośledzenia przesączania kłębuszkowego [1].

Klasyfikacja histopatologiczna toczniowego zapalenia nerek, opracowana przez *International Society of Nephrology/Renal Pathology Society* (ISN/RPS) w roku 2003 i opublikowana w roku 2004, wyróżnia ich 6 klas (tab. I).

Biopsja nerki jest złotym standardem w diagnostyce nefropatii toczniowej. W wielu badaniach ustalono, że odwlekanie decyzji o jej wykonaniu wiąże się z ryzykiem progresji choroby prowadzącej do niewydolności nerek [7]. Wczesne wykrycie zmian nerkowych i odpowiednie leczenie zwiększa szanse na dobry wynik terapeutyczny [8]. Wykazano, że wydłużenie czasu życia pacjentów z *lupus nephritis* ma bezpośredni związek z wczesnym wykonaniem biopsji i odpowiednimi decyzjami terapeutycznymi [9], które nie powinny być oparte tylko na wykładnikach niewydolności nerek, np. na zwiększonym stężeniu kreatyniny, ponieważ taki stan obserwuje się zarówno w przypadkach aktywnych, jak i w przewlekłym toczniowym zapaleniu nerek. Należy pamiętać, że zastosowane odpowiednio wcześnie leczenie immunosupresyjne może się przyczynić do cofnięcia zmian aktywnych, natomiast w przypadkach przewlekłych może nasilać objawy azotemii i niewydolności nerek. Bardzo interesujące są wyniki trwającego 3 lata badania obejmującego 91 pacjentów z SLE, z których 42 nie miało objawów zajęcia nerek, a u 49 występował białkomocz nieprzekraczający 1 g/dobę. W grupie bez-

Tabela I. Klasyfikacja histopatologiczna toczniowego zapalenia nerek**Table I.** *Histopathological classification of lupus nephritis*

Klasa I	Toczniove zapalenie nerek z nieznacznymi zmianami w mezangium (prawidłowe kłębuszki nerkowe w mikroskopie świetlnym ze złogami immunologicznymi w mezangium w mikroskopie fluorescencyjnym)
Klasa II	Mezangialne rozplemowe toczniowe zapalenie nerek: różnie nasilony rozplm komórek mezangialnych i/lub gromadzenie macierzy pozakomórkowej w mikroskopie świetlnym ze złogami w mikroskopie fluorescencyjnym, wykrywane pojedyncze złogi podnabłonkowe lub podśródbłonkowe, niewidoczne w mikroskopie świetlnym
Klasa III	Ogniskowe toczniowe zapalenie nerek (aktywne lub nieaktywne, ogniskowe z segmentalnym lub globalnym rozplmem wewnątrzwołniczkowym lub zewnątrzwołniczkowym, obejmującym 50% kłębuszków nerkowych, z segmentalnymi złogami podśródbłonkowymi): <ul style="list-style-type: none"> • III (A) – ogniskowe rozplmowe aktywne toczniowe zapalenie nerek • III (B) – ogniskowe rozplmowe toczniowe zapalenie nerek ze zmianami aktywnymi i sklerotycznymi • III (C) – ogniskowe toczniowe zapalenie nerek ze zmianami sklerotycznymi (nieaktywne)
Klasa IV	Rozlane toczniowe zapalenie nerek (rozlane, segmentalny lub globalny rozplm wewnątrzwołniczkowy lub zewnątrzwołniczkowy zawierający 50% kłębuszków nerkowych z rozlanymi złogami podśródbłonkowymi, ze zmianami aktywnymi i sklerotycznymi): <ul style="list-style-type: none"> • IV-S (A) – rozlane rozplmowe segmentalne toczniowe zapalenie nerek (aktywne) • IV-G (A) – rozlane rozplmowe globalne toczniowe zapalenie nerek (aktywne) • IV-S (A/C) – rozlane rozplmowe segmentalne toczniowe zapalenie nerek ze zmianami aktywnymi i sklerotycznymi • IV-G (A/C) – rozlane rozplmowe globalne toczniowe zapalenie nerek ze zmianami aktywnymi i sklerotycznymi • IV-S (C) – rozlane segmentalne toczniowe zapalenie nerek ze zmianami sklerotycznymi (nieaktywne) • IV-G (C) – rozlane globalne toczniowe zapalenie nerek ze zmianami sklerotycznymi (nieaktywne)
Klasa V	Błoniaste toczniowe zapalenie nerek z towarzyszącymi zmianami typowymi dla klasy III lub IV z zaawansowaną sklerotyzacją kłębuszków
Klasa VI	Zaawansowane toczniowe zapalenie nerek ze sklerotyzacją kłębuszków (> 90% kłębuszków z globalną sklerotyzacją)

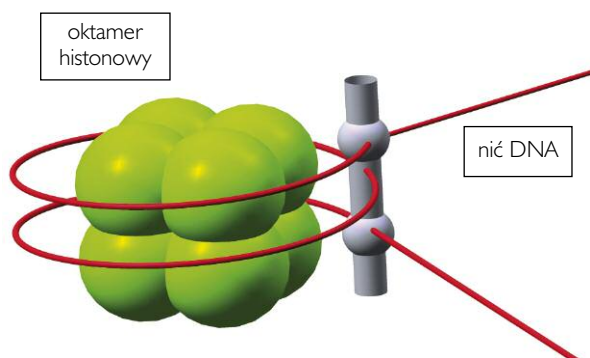
objawowej u jednego pacjenta stwierdzono zmiany nerkowe klasy I, a u pozostałych klasy II i wyższych, natomiast w grupie osób z białkomoczem poniżej 1 g/dobę prawie u połowy chorych stwierdzono klasę IV *lupus nephritis* [10]. Wyniki te świadczą o bardzo wczesnym zajęciu nerek w przebiegu SLE i konieczności ich wczesnej diagnostyki.

W ostatnich latach w piśmiennictwie wiele miejsca zajmują doniesienia o dużym znaczeniu diagnostycznym i prognostycznym przeciwciał skierowanych przeciwko nukleosomom. Nukleosomy są zorganizowanymi podjednostkami chromosomów składającymi się z 8 histonów rdzeniowych-2x (H2A, H2B, H3 i H4) i około 200 par zasad DNA. Ich centrum złożone jest z tetrameru H3-H3-H4-H4, który z każdej

strony otoczony jest dimerem H2A-H2B. Podwójna spirala DNA zawierająca 146–148 par zasad owinięta jest dookoła podjednostki histonów. Struktury te ułożone są w formie sznura koralu, a łańcuch DNA pomiędzy nimi wiąże się z histonem H1, który znajduje się niejako na zewnątrz tej struktury (ryc. 1).

Nukleosomy są głównymi antygenami jądrowymi uwalnianymi w wyniku działania endonukleaz w procesie apoptozy. Po utracie przez komórkę integralności nukleosomy przedostają się na zewnątrz i jeśli nie są natychmiast usuwane, może dochodzić do autoimmunizacji. W trakcie apoptozy następuje modyfikacja białek, które stają się autoantygenami. Na białka wpływają kaspaza, granzym B, które mediują rozkład, defosforylację, citrulinację, transglutaminację i wiele innych modyfikacyjnych procesów prowadzących do autoimmunizacji. Podobne zmiany obejmują nukleosomy.

Obecność przeciwciał przeciwko nukleosomom stwierdzono głównie u pacjentów z SLE. Wykazano, że są one wysoce specyficzne dla tej choroby, a częstość ich występowania wynosi według różnych autorów od 50% do 100% [11]. W innych chorobach tkanki łącznej: w twardzinie układowej, *morphea*, mieszanej chorobie tkanki łącznej (ang. *mixed connective tissue disease*), *dermatomyositis*, przeciwciała przeciwko nukleosomom były wykrywane, ale w dużo mniejszym odsetku przypadków niż w SLE [12]. Przeciwciała te wykazano także u pacjentów z pierwotnym APS [13]. U wielu pacjentów przeciwciała przeciwko



Rycina 1. Schemat nukleosomu
Figure 1. Structure of nucleosome

nukleosomom występują we wczesnych stadiach choroby i mogą być, zdaniem Simona i wsp., przydatnym markerem, zwłaszcza w przypadkach zespołów toczniopodobnych oraz u pacjentów z pierwotnym APS, u których w przyszłości rozwinie się SLE [14]. Nie stwierdzono przeciwciał przeciwko nukleosomom w surowicach ludzi zdrowych.

Wiele danych wskazuje na to, że przeciwciała przeciwko nukleosomom są czułym i specyficznym markerem SLE [15]. Pojawiają się one w surowicy pacjentów bardzo wcześnie, przed innymi markerami, takimi jak przeciwciała przeciwko natywnemu DNA (dsDNA) [16]. Uważa się, że zarówno przeciwciała przeciwko dsDNA, jak i przeciwko nukleosomom odgrywają rolę patogenną w SLE [17]. Jak wykazały badania na modelach zwierzęcych myszy (NZBxNZW)F1, elektronowo gęste obszary w błonie podstawnej kłębuszków nerkowych stwierdzane w mikroskopie elektronowym zawierają kompleksy immunologiczne [18]. Za pomocą przeciwciał monoklonalnych wykazano, że ich składową są nukleosomy. Dokładne badania materiału pochodzącego z biopsji nerek, zarówno od pacjentów z nefropatią toczniową, jak i od myszy (NZBxNZW)F1, wykazały, że elektronowo gęste struktury zawierają nukleosomy. Nukleosomy znajdują się w błonie podstawnej łącznie z przeciwciałami, a elektronowo gęste obszary zawierają zarówno nukleosomy, jak i przeciwciała [18]. Wyniki te zaprzeczają teorii, że związane *in vivo* przeciwciała rozpoznają antygeny nienukleosomowe, takie jak laminina, kolagen czy α -aktynina [19]. W świetle obecnych obserwacji istnieją dwie możliwości – albo nukleosomy początkowo wiążą się z błoną podstawną i stają się docelową strukturą dla przeciwciał skierowanych przeciwko nim, albo łączą się z błoną podstawną już jako kompleksy immunologiczne. Opisano, że same nukleosomy mają znaczenie patogenne, ponieważ mogą indukować sekrecję interleukiny 6, hamować fagocytozę i wpływać na funkcję komórek mezangium kłębuszka nerkowego [20].

Wstrzyknięcie zdrowym myszom syngenicznych komórek apoptotycznych stymuluje produkcję przeciwciał przeciwjądrowych (ang. *antinuclear antibodies* – ANA) i odkładanie się kompleksów immunologicznych w nerkach [21]. W przebiegu SLE u ludzi wzrastającemu poziomowi komórek apoptotycznych towarzyszy podwyższony poziom DNA i nukleosomów. Stwierdzono również komórki apoptotyczne w zmianach skórnych i w nerkach. Uważa się, że upośledzony proces usuwania komórek apoptotycznych wiąże się nie tyle z defektem ich pochłaniania przez komórki fagocytyczne, ile raczej z nieprawidłowym ich rozpoznawaniem. Upośledzona identyfikacja komórek apoptotycznych i ich słaba fagocytoza ma prawdopodobnie związek ze związanymi na ich

powierzchni autoprzeciwciałami skierowanymi przeciwko różnym strukturom, np. kompleks β_2 -glikoproteiny-1/fosfatydyloseryny [22]. Wydaje się, że poprzez związane autoprzeciwciała zostaje schowany ligand dla receptora komórek fagocytycznych, co uniemożliwia prawidłowe rozpoznawanie komórek apoptotycznych i ich fagocytozę. Komórki apoptotyczne są źródłem zewnątrzkomórkowej chromatyny dostępnej dla przeciwciał, co skutkuje tworzeniem kompleksów immunologicznych.

CEL PRACY

Uznanymi markerami immunologicznymi SLE są przeciwciała skierowane przeciwko dsDNA i antygenowi Sm. Przeciwciała przeciwko dsDNA stwierdza się w 50% przypadków SLE, głównie u chorych na *lupus nephritis*. W związku z niejednoznaczными danymi z piśmiennictwa co do wartości diagnostycznej i prognostycznej przeciwciał przeciwko nukleosomom u pacjentów z SLE celem pracy była ocena częstości ich występowania we własnej grupie chorych oraz ich związku ze zmianami w nerkach o charakterze białkomoczu i/lub z występowaniem nefropatii stwierdzonej na podstawie wyniku biopsji nerki.

MATERIAŁ I METODYKA

Badaniem objęto 52 pacjentów z SLE – 49 kobiet i 3 mężczyzn w wieku 19–78 lat (mediana 46,5, średnia $44,6 \pm 14,9$ roku). Choroba u pacjentów trwała od 1 miesiąca do 33 lat (mediana 10,0, średnia $11,9 \pm 10,4$ roku). Początek schorzenia odnotowano między 4. a 78. rokiem życia (mediana 29,0, średnia $32,3 \pm 15,2$ roku). Wszyscy pacjenci spełnili co najmniej cztery kryteria ACR rozpoznania SLE. Aktywność procesu chorobowego mierzona ogólnie przyjętą skalą SLAM mieściła się między 3 a 30, mediana wynosiła 9,00, a średnia $10,0 \pm 5,5$. Średni wiek pacjentów niemających przeciwciał przeciwko nukleosomom wynosił $44,71 \pm 14,24$ roku (dolny kwartył 33,5, mediana 47,0, górny kwartył 55,0), natomiast u osób z obecnymi przeciwciałami średnia wynosiła $44,35 \pm 16,21$ roku (dolny kwartył 34,0, mediana 43,0, górny kwartył 56,0). Grupę kontrolną stanowiło 50 pacjentów z twardziną układową.

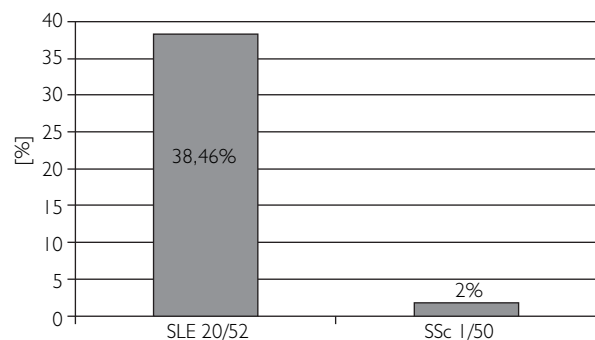
Przeciwciała przeciwjądrowe oznaczano metodą immunofluorescencji pośredniej na komórkach Hep-2. Do wykrywania i identyfikacji przeciwciał przeciwko nukleosomom zastosowano test jakościowy ANA Profil 3 Euroline (firmy Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG, Niemcy). Test immunofluorescencji na komórkach wiciowca *Crithidia luciliae*, których kinetoplast stanowi źródło natywnego DNA wykonywano w celu wykrycia autoprzeciwciał prze-

ciwko dsDNA. Do badań użyto preparatu firmy Inova, Nova Lite dsDNA.

W celu zbadania wciągnięcia nerek w proces chorobowy przeprowadzono trzykrotną dobową zbiórkę moczu na obecność białka oraz określenie stopnia białkomoczu. Jako znamienne przyjęto białkomocz powyżej 0,5 g/dobę. Uwzględniono również wyniki biopsji nerek wskazujące na klasę nefropatii.

Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej, w której do opisu zmiennych ilościowych użyte zostały standardowe statystyki opisowe: wartości średnie, odchylenia standardowe oraz mediany i zakresy. Dla zmiennych ilościowych badana była hipoteza o zgodności rozkładu danej cechy z rozkładem normalnym. W tym celu użyto testu Shapiro-Wilka oraz testu graficznego typu Q-Q (Q-Q plot). Przy porównaniu dwóch grup dla zmiennych ilościowych użyto testu Wilcoxon dla prób niezależnych (*Wilcoxon Rank-Sum Test*), ponieważ rozkłady tych zmiennych wykazywały odchylenia od rozkładu normalnego. Związek pomiędzy zmiennymi jakościowymi badanymi w układzie tabel kontyngencji za pomocą testu χ^2 lub dokładnego testu Fishera, gdy wartości oczekiwane w komórkach tabeli nie były wystarczająco duże (tzn. powyżej 5).



Rycina 2. Występowanie przeciwciał przeciwko nukleosomom u pacjentów z SLE i twardziną układową

Figure 2. Presence of antinucleosome antibodies in patients with SLE and systemic sclerosis

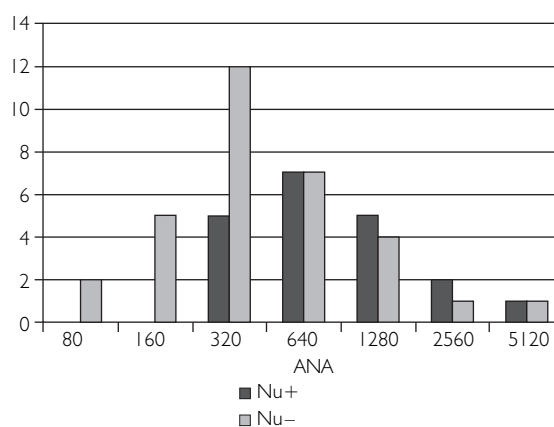
WYNIKI

Przeciwciała przeciwko nukleosomom (Nu+) obecne były u 20 z 52 (38,46%) pacjentów z SLE (w tym u 19 kobiet – 95%, oraz u 1 mężczyzny – 5%), natomiast nie stwierdzono ich (Nu-) u 32 (61,54%) pacjentów (u 30 kobiet – 93,75%, oraz u 2 mężczyzn – 6,25%). Tylko u 1 pacjenta z 50 (2%) z twardziną układową wykryto przeciwciała przeciwko nukleosomom (ryc. 2.).

Nie wykazano istotnych statystycznie różnic pod względem płci (w obu grupach znacznie przeważały kobiety), wieku, wieku w chwili początku choroby ani czasu trwania choroby pomiędzy pacjentami z przeciwciałami przeciwko nukleosomom a pacjentami bez tych przeciwciał.

W grupie pacjentów, u których nie stwierdzono przeciwciał przeciwko nukleosomom, miana ANA na komórkach Hep-2 mieściły się między 80 a 5120 (średnia $690 \pm 955,85$, dolny kwartyl 320, mediana 320, górny kwartyl 640). U pacjentów z przeciwciałami przeciwko nukleosomom występowały wyższe miana przeciwciał ANA (średnia $1136 \pm 1148,98$, dolny kwartyl 480, mediana 640, górny kwartyl 1280) (tab. II).

Analiza statystyczna z użyciem testu Wilcoxon wykazała istotnie statystycznie ($p = 0,0119$) wyższe miana przeciwciał ANA u pacjentów z przeciwciała-



Rycina 3. Różnice mian ANA w teście IIF u pacjentów z SLE z przeciwciałami przeciwko nukleosomom i bez nich

Figure 3. Differences in ANA titers in IIF test in patients with and without antinucleosome antibodies

Tabela II. Miana przeciwciał przeciwjądrowych w teście IIF na komórkach Hep-2

Table II. ANA titers in IIF test on Hep-2 cells

Występowanie autoprzeciwciała	Miana przeciwciał ANA w teście IIF na komórkach Hep-2							Razem
	80	160	320	640	1280	2560	5120	
Nu+	–	–	5 (25%)	7 (35%)	5 (25%)	2 (10%)	1 (5%)	20
Nu–	2 (6,25%)	5 (15,6%)	12 (37,5%)	7 (21,5%)	4 (37,5%)	1 (12,5%)	1 (3,1%)	32
razem	2 (3,8%)	5 (9,6%)	17 (32,7%)	14 (26,9%)	9 (17,3%)	3 (5,8%)	2 (3,8%)	52

Tabela III. Białkomocz u pacjentów z przeciwciałami przeciwko nukleosomom i bez tych przeciwciał
Table III. Proteinuria in patients with and without antinucleosome antibodies

Współistnienie przeciwciał	Białkomocz > 0,5 g/dobę	Białkomocz < 0,5 g/dobę	Bez białkomoczu	Razem
Nu+	11 (55%)	6 (30%)	3 (15%)	20 (100%)
Nu-	4 (12%)	12 (38%)	16 (50%)	32 (100%)
razem	15	17	20	52

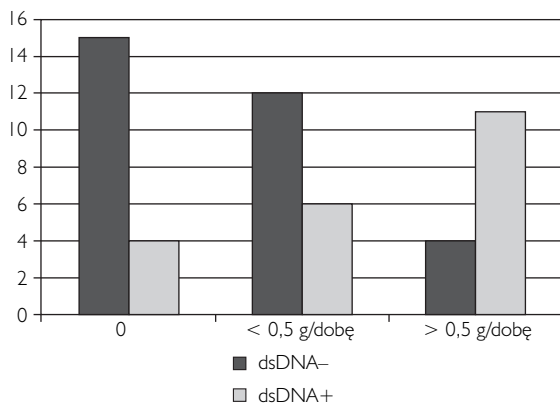
mi przeciwko nukleosomom w porównaniu z grupą pacjentów bez tych przeciwciał (ryc. 3).

Przeciwciała przeciw dsDNA wykrywane na komórkach *Crithidia luciliae* występowały u 16 z 20 (80%) pacjentów z dodatnimi przeciwciałami przeciwko nukleosomom. U pacjentów bez przeciwciał przeciwko nukleosomom odnotowano ich obecność w 5 z 32 (15,63%) przypadków. Zarówno z użyciem dokładnego testu Fishera, jak i testu χ^2 wykazano wyraźną statystycznie dodatnią zależność między występowaniem przeciwciał przeciwko nukleosomom a występowaniem przeciwciał dsDNA.

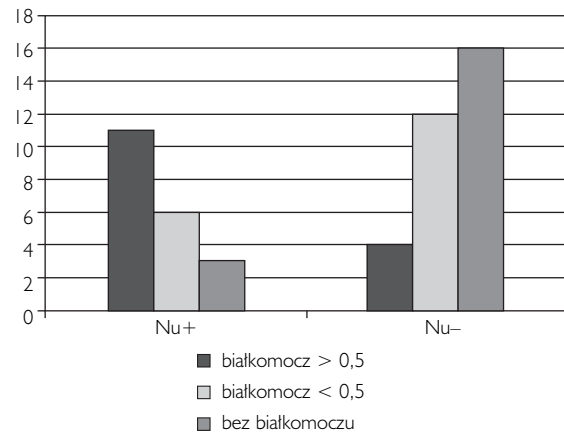
Znamienny białkomocz, powyżej 0,5 g/dobę, występował u 11 z 20 (55%) pacjentów z przeciwciałami przeciwko nukleosomom. W tej grupie nie stwierdzono białka w moczu jedynie w 3 przypadkach. U pacjentów bez przeciwciał przeciwko nukleosomom w 50% przypadków nie stwierdzono białkomoczu (tab. III, ryc. 4).

Analiza statystyczna z użyciem dokładnego testu Fishera i χ^2 wykazała istotną statystycznie różnicę występowania białkomoczu u pacjentów z przeciwciałami przeciwko nukleosomom w porównaniu z pacjentami bez tych przeciwciał (odpowiednio $p = 0,0025$ i $p = 0,0024$).

Przeciwciała anti-dsDNA wykryte na komórkach *Crithidia luciliae* w 11 przypadkach występowały u pacjentów z białkomoczem powyżej 0,5 g/dobę (ryc. 5). Analiza statystyczna z użyciem dokładnego testu Fishera i χ^2 wykazała istotną statystycznie róż-



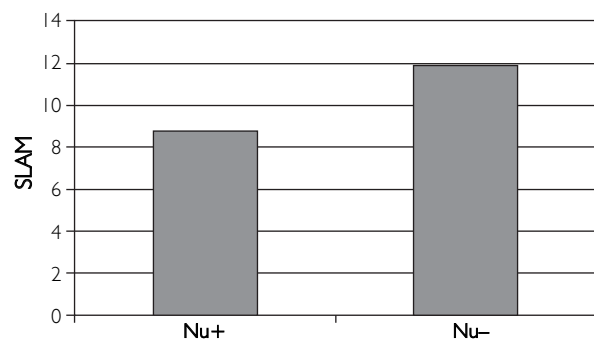
Rycina 5. Różnice w występowaniu białkomoczu u pacjentów z przeciwciałami przeciwko dsDNA i bez nich
Figure 5. Differences in presence of proteinuria in patients with and without anti-dsDNA antibody



Rycina 4. Różnice w występowaniu białkomoczu u pacjentów z przeciwciałami przeciwko nukleosomom i bez nich
Figure 4. Differences in presence of proteinuria in patients with and without antinucleosome antibodies

nicę występowania białkomoczu u pacjentów z obecnymi przeciwciałami przeciwko dsDNA w porównaniu z osobami bez tych przeciwciał (odpowiednio $p = 0,0076$ i $p = 0,0065$).

U pacjentów z obecnymi przeciwciałami przeciwko nukleosomom stwierdzono wyższą aktywność procesu chorobowego ocenianą w skali SLAM (średnia 11,9, odchylenie standardowe 6,58, mediana 11,0, dolny kwartył 9,0, górny kwartył 14,5) niż u pacjentów bez tych przeciwciał (średnia 8,75, odchylenie



Rycina 6. Średnia aktywność SLE w skali SLAM u pacjentów z przeciwciałami przeciwko nukleosomom
Figure 6. Activity of SLE in patients with antinucleosome antibodies (SLAM scale)

standardowe 4,32, mediana 7,5, dolny kwartył 5,5, górny kwartył 11,0) (ryc. 6.).

Aktywność choroby w skali SLAM była wyższa u pacjentów z przeciwciałami przeciwko nukleosomom (w teście Wilcoxon $p = 0,0648$, na granicy znaczenia statystycznej), co sugeruje wyraźną tendencję do występowania cięższego przebiegu choroby w tej grupie pacjentów.

OMÓWIENIE

Toczeń rumieniowaty układowy to interdyscyplinarna choroba autoimmunologiczna i choć jest ona znana od wielu lat, wciąż wiele zachodzących w niej procesów patologicznych pozostaje niewyjaśnionych. Na świecie ciągle trwają badania nad nowymi, bardziej specyficznymi i czułymi metodami diagnostyki, monitorowaniem przebiegu i leczeniem SLE.

Wykrywanie przeciwciał ANA jest bardzo ważnym elementem diagnostyki pacjentów z SLE. Niektóre z nich pojawiają się przed klinicznym początkiem choroby, inne wiążą się ze specyficznymi objawami i wskazują na potrzebę rozszerzenia diagnostyki.

W ostatnich latach pojawiło się wiele publikacji dotyczących autoprzeciwciał przeciwko nukleosomom, które mogłyby być czułym markerem tocznia rumieniowatego układowego, zwłaszcza jego aktywnych postaci, w tym przebiegających z zajęciem nerek [14–18].

Uważa się, że rdzeń nukleosomu pozbawiony histonu H1, zawierający 146–148 par zasad DNA, oraz histony rdzeniowe H2A, H2B, H3, H4 są bardzo słabo immunogenne. Immunogenne wydają się zmienione nukleosomy, np. w trakcie procesu apoptozy. Podczas tego procesu konstytutywne DNA i histony poddawane są zmianom, a histony potranslacyjnym modyfikacjom. W sprzyjających okolicznościach, przy nadmiarze uwolnionego materiału apoptotycznego i upośledzonym jego usuwaniu te zmienione nukleosomy odgrywają istotną rolę w zaburzeniach równowagi między tolerancją immunologiczną i autoimmunizacją. Stymulacja autoreaktywnych limfocytów T, a następnie limfocytów B prowadzi do produkcji autoprzeciwciał skierowanych przeciwko nukleosomom, histonom i natywnemu dwuniciowemu DNA. Według Mullera i wsp. [23] patogenność przeciwciał przeciwko nukleosomom może się wiązać np. z opsonizacją komórek apoptotycznych, indukcją apoptozy, aktywacją komórek prezentujących antygen za pośrednictwem kompleksów immunologicznych złożonych z nukleosomów i przeciwciał skierowanych przeciwko nim. Patogenną rolę odgrywa także wiązanie tych kompleksów immunologicznych do cząsteczek błony

podstawnej, takich jak siarczan heparanu, laminina, kolagen IV, lub bezpośrednio wiązanie przeciwciał przeciwko nukleosomom do krzyżowo reagujących cząsteczek, np. α -aktyniny. Dokładne badania w mikroskopie elektronowym wykazały zarówno u ludzi z toczniem, jak i w modelach zwierzęcych, że przeciwciała przeciwko nukleosomom współwystępują w błonie podstawnej kłębuszków nerkowych z fragmentami apoptotycznej chromatyny [23].

Zmiany nerkowe są jednym z najpoważniejszych objawów SLE. Kompleksy immunologiczne odkładają się w kłębuszkach nerkowych (podśródbłonkowo, podnabłonkowo, w mezangium, wzdłuż błon podstawnych cewek nerkowych, w ścianach tętniczek wewnątrznerkowych), co prowadzi do rozwoju stanu zapalnego oraz destrukcji mięszu nerki. Objawy nefropatii toczniowej występują u 30–80% pacjentów z SLE. Zazwyczaj zmiany te poprzedzone są innymi objawami tocznia: zapaleniem stawów, zmianami skórными czy zaburzeniami hematologicznymi, ale mogą być również (prawie u 25% pacjentów) pierwszym objawem choroby. Kompleksy immunologiczne odkładające się w postaci złogów odgrywają istotną rolę w rozwoju tocznia nerkowego. Fragmenty chromatyny zawarte w tych kompleksach mogą być zarówno czynnikiem wywołującym, jak i celem dla przeciwciał skierowanych przeciwko dsDNA i nukleosomom [24]. Nukleosomy stwierdzono w kłębuszkowych depozytach u pacjentów z toczniem nerkowym i uzyskiwano z eluatów kłębuszkowych [25]. Nie wiadomo, w jaki sposób powstają *in vivo* kompleksy immunologiczne złożone z nukleosomów i przeciwciał przeciwko nim skierowanych. Znane są trzy teorie dotyczące ich powstawania. Pierwsza z nich zakłada, że kompleksy immunologiczne tworzą się poprzez połączenie przeciwciał i nukleosomów uwolnionych z komórek apoptotycznych, a następnie osadzają się w mięszu nerki oraz inicjują kaskadę zapalną, co zaburza proces filtracji i prowadzi do proteinurii. Nie wiadomo, gdzie dokładnie tworzą się kompleksy immunologiczne [24]. Druga teoria mówi o przyłączeniu nukleosomu do błony podstawnej kłębuszka, w której zostaje on uwięziony i staje się docelową strukturą dla przeciwciał przeciwko niemu skierowanych. Połączenie dodatnio naładowanych części histonów eksponowanych na powierzchni nukleosomów z ujemnie naładowanymi komponentami błony podstawnej kłębuszków nerkowych, takimi jak siarczan heparanu i kolagen IV, warunkuje przywiązanie nukleosomu do błony podstawnej. Nie jest jednak pewne, czy kompleksy immunologiczne wiążą się z błoną podstawną, czy też najpierw przyłączają się do niej nukleosomy, a następnie są one rozpoznawane *in situ* przez przeciwciała [25]. Trzecia teoria dotyczy krzyżowego

wiązania się przeciwciał do nerkowych antygenów, takich jak α -aktywnina czy laminina [19].

Obecność w surowicach pacjentów z SLE przeciwciał przeciwko nukleosomom w klasie IgG, zwłaszcza w klasie IgG3, może być nowym markerem szczególnie aktywnego SLE, a przede wszystkim tocznia nerkowego. Ponadto wiele danych wskazuje na to, że przeciwciała przeciwko nukleosomom występują w surowicy chorych na SLE bardzo wcześnie, zanim pojawią się inne markery, np. przeciwciała przeciwko dsDNA [26]. Stosując testy Euroimmune II generacji, stwierdzono je nie tylko u pacjentów z aktywną postacią choroby, lecz także w przypadkach nieaktywnych, w których nie występowały przeciwciała dsDNA. Zdaniem niektórych autorów przeciwciała przeciwko nukleosomom mogą być bardziej czułym markerem SLE niż przeciwciała przeciwko dsDNA [27]. W innych badaniach nie wykazano większej koncentracji przeciwciał przeciwko nukleosomom w surowicach pobranych od pacjentów z III i IV klasą *lupus nephritis* w porównaniu z pacjentami z tzw. *inactive lupus nephritis*, natomiast przeciwciała anty-dsDNA były obecne w znacznie większym mianie w przypadkach *lupus nephritis* niż w *inactive nephritis*. Bigler i wsp. wykazali obecność przeciwciał przeciwko nukleosomom u 89% pacjentów z *lupus nephritis* i u 80% bez zmian nerkowych, podczas gdy zmianom nerkowym w większym odsetku towarzyszyły przeciwciała anty-dsDNA (94,3%), które stwierdzono w 84,5% u pacjentów bez zmian nerkowych [28]. Wyniki te z jednej strony wskazują na częstsze występowanie przeciwciał przeciwko nukleosomom w *lupus nephritis*, a z drugiej na ich ograniczoną przydatność w określaniu aktywności zmian nerkowych.

Podobne wyniki – brak istotnej statystycznie różnicy pomiędzy występowaniem przeciwciał przeciwko nukleosomom i zajęciem nerek – uzyskali Pradhan i wsp. [29], Ravirajan i wsp. [30] i Quattrocchi i wsp. [31]. Z kolei Bennuci i wsp. wykazali, że u pacjentów z dodatnimi przeciwciałami przeciwko nukleosomom występuje bardziej aktywny osad moczowy niż u pacjentów bez tych przeciwciał [32].

W materiale własnym w 55% przebadanych przypadków z przeciwciałami przeciwko nukleosomom wykryto patologię w obrębie nerek, objawiającą się znamienym białkomoczem powyżej 0,5 g/dobę i/lub nefropatią potwierdzoną wynikiem biopsji nerki, natomiast u 30% pacjentów z przeciwciałami przeciwko nukleosomom białkomocz wynosił poniżej 0,5 g/dobę. Tylko u 12% pacjentów, u których nie stwierdzono przeciwciał przeciwko nukleosomom, występował znamienny białkomocz i/lub nefropatia toczniowa. Analiza statystyczna z użyciem dwóch testów (dokładnego testu Fishera i χ^2) wykazała, że

istotnie statystycznie częściej nerki były zajęte u pacjentów z obecnymi przeciwciałami przeciwko nukleosomom (odpowiednio $p = 0,0025$ i $p = 0,0024$). Podobne wyniki dotyczące silnego związku przeciwciał przeciwko nukleosomom z zajęciem nerek uzyskali: Hung i wsp. [33], Berden i wsp. [34], Bruns i wsp. [35], Bennuci i wsp. [32], Simon i wsp. [36], Dözügün i wsp. [37] i Cairns i wsp. [15]. W badaniu Simona i wsp. [36], oprócz zajęcia nerek, uzyskano istotny związek występowania przeciwciał przeciwko nukleosomom ze zmianami stawowymi oraz zmianami o charakterze *malar rash* i owrzodzeniami na błonach śluzowych. Dotyczyło to pacjentów z toczniem o wczesnym początku choroby.

Według wielu badaczy poziom przeciwciał przeciwko nukleosomom koreluje z poziomem przeciwciał przeciwko dsDNA [38], ale są też przypadki, w których stwierdza się przeciwciała przeciwko nukleosomom przy braku przeciwciał przeciwko dsDNA [39]. W badaniach Dözügün i wsp. stwierdzono, że spośród 39% pacjentów z zajęciem nerek u 74,5% występowały przeciwciała przeciwko nukleosomom, a u 78,4% przeciwciała przeciwko dsDNA, natomiast w grupie osób, u których nie stwierdzono przeciwciał przeciwko dsDNA, przeciwciała przeciwko nukleosomom występowały u 31,4% [37]. W badaniach Su i wsp. wśród 61% chorych z przeciwciałami antynukleosomowymi przeciwciała anty-dsDNA nie były obecne u 51% [40]. W innym badaniu spośród 79% pacjentów z obecnymi przeciwciałami przeciwko nukleosomom u 24% nie wykryto przeciwciał przeciwko dsDNA [41].

Podobnie w materiale własnym u 20% (u 4 z 20) chorych z autoprzeciwciałami nukleosomowymi nie wykryto przeciwciał anty-dsDNA w teście na *Crithidia luciliae*, natomiast 16% chorych bez autoprzeciwciał nukleosomowych miało przeciwciała przeciwko dsDNA, co wskazuje, że w diagnostyce SLE należy wykonywać badania zarówno w kierunku przeciwciał przeciwko dsDNA, jak i przeciwko nukleosomom. Dane te wskazują również, że przeciwciała przeciwko nukleosomom mogą być szczególnie pomocne w diagnostyce przypadków SLE, w których nie występują przeciwciała przeciwko dsDNA. W materiale własnym wykazano ponadto, że miana przeciwciał przeciwko dsDNA w teście immunofluorescencji pośredniej były istotnie statystycznie wyższe u pacjentów z przeciwciałami przeciwko nukleosomom ($p < 0,0001$) w porównaniu z pacjentami bez tych przeciwciał.

W wielu badaniach podkreśla się związek obecności przeciwciał przeciwko nukleosomom z nasileniem aktywności SLE. W badaniach Hung i wsp. [33] wykazano silny związek poziomu przeciwciał przeciwko nukleosomom z aktywnością choroby w skali BILAG. Z kolei Ghirardelloa i wsp. w swoich

dwuletnich badaniach z użyciem skali ECLAM i SLICC/ACR nie stwierdzili związku pomiędzy poziomem przeciwciał przeciwko nukleosomom a aktywnością SLE i uszkodzeniem narządów wewnętrznych [42]. W badaniach Düzgön i wsp. [37], Su i wsp. [40] oraz Suleiman i wsp. [43] wykazano natomiast korelację między występowaniem przeciwciał przeciwko nukleosomom a nasileniem aktywności choroby w skali SLEDAI. Różnica ta może być związana z różnymi metodami oceny aktywności choroby, różną długością czasu jej trwania, wpływem leczenia oraz różnicami populacyjnymi.

Oznaczanie przeciwciał przeciwko nukleosomom może mieć implikacje terapeutyczne. W badaniu Grootsholten i wsp. wykazano, że leczenie cyklofosfamidem lub azatiopryną obniża ich poziom [44]. Rozwój badań nad nukleosomami i patomechanizmami z nimi związanymi pozwolił na opracowanie nowych immunoterapii, które stosuje się na razie u myszy z toczniem. Podając myszom syntetyczne peptydy, pochodne nukleosomów, próbuje się modulować reaktywność limfocytów Th, sekrecję cytokin i produkcję przeciwciał przez limfocyty [45]. Uzyskane wyniki są bardzo obiecujące. Zaobserwowano obniżenie się poziomu autoprzeciwciał, opóźnienie rozwoju powikłań nerkowych oraz wpływ na regulację limfocytów T [42]. Jest szansa, że w przyszłości podobne terapie będzie można stosować u ludzi.

Piśmiennictwo

- Niemir Z., Wągrowaska-Danilewicz M.: Zmiany w nerkach w toczniu rumieniowatym układowym. *Pol Merk Lek* 2010, 28, 144-151.
- Leaker B., Fairley K.F., Dowling J., Kincaid-Smith P.: Lupus nephritis: clinical and pathological correlation. *QJM* 1987, 62, 163-179.
- de Zubiria Salgado A., Herrera-Diaz C.: Lupus nephritis: an overview of recent findings. *Autoimmune Dis* 2012, 2012, 849684.
- Cameron J.S.: Lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol* 1999, 10, 413-424.
- Weening J.J., D'Agati V.D., Schwartz M.M.: The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Kidney Int* 2004, 65, 521-530.
- Schwartz M.M., Korbet S.M., Katz R.S., Lewis E.J.: Evidence of concurrent immunopathological mechanism determining the pathology of severe lupus nephritis. *Lupus* 2009, 18, 149-158.
- Faurschou M., Starklint H., Halsberg P., Jacobsen S.: Prognostic factors in lupus nephritis: diagnostic and therapeutic delay increases the risk of terminal renal failure. *J Rheumatol* 2006, 33, 1563-1569.
- Burnstein D.M., Schwartz M.M., Korbet S.M.: Percutaneous renal biopsy with the use of renal-time ultrasound. *Am J Nephrol* 1991, 11, 195-200.
- Esdale J.M., Joseph L., MacKenzie T., Kashgariou M., Heyslett J.P.: The benefit of early treatment with immunosuppressive agents in lupus nephritis. *J Rheumatol* 1994, 21, 2046-2051.
- Zabaleta-Lanz M., Vargas-Arenas R.E., Tapanes F., Daboin I., Atahualpa Pinto J., Bianco N.E.: Silent nephritis in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2003, 12, 26-30.
- Gomez-Puerta J.A., Burlingame R.W., Cervera R.: Anti-chromatin (anti-nucleosome) antibodies: diagnostic and clinical value. *Autoimmun Rev* 2008, 7, 606-611.
- Wallace D.J., Lin H.C., Shen G.Q., Lewis E.J.: Antibodies to histone (H2A-H2B)-DNA complexes in the absence of antibodies to double-stranded DNA or to (H2A-H2B) complexes are more sensitive and specific for scleroderma-related disorders than for lupus. *Arthritis Rheum* 1994, 37, 1795-1797.
- Andreoli L., Pregnotato F., Burlingame R.W., Allegri F., Rizzini S., Fanelli V. i inni: Antinucleosome antibodies in primary antiphospholipid syndrome: a hint at systemic autoimmunity? *J Autoimmun* 2008, 30, 51-57.
- Abraham Simon J., Rojas-Serrano J., Cebiedes J., Alcocer-Varela J.: Antinucleosome antibodies may help predict development of systemic lupus erythematosus in patient with primary antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2004, 13, 177-181.
- Cairns P.A., McMillan S.A., Crockard A.D., Meenagh G.K., Duffy E.M., Amsrong I. i inni: Antinucleosome antibodies in the diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2003, 62, 272-273.
- Amoura Z., Chabre H., Koutouzov S., Lotton C., Cabrespines A., Bach J.F.: Nucleosome restricted antibodies are detected before anti-dsDNA and/or antihistone antibodies in serum of MRL-Mp lpr/lpr and +/- mice, and are present in kidney eluates of lupus mice with proteinuria. *Arthritis Rheum* 1994, 37, 1684-1688.
- Kramers C., Hykema M.N., van Bruggen M.C., van de Lagemaat R., Dijkman H.B., Assmann K.J. i inni: Antinucleosome antibodies complexed to nucleosomal antigens show anti-DNA reactivity and bind to rat glomerular basement membrane in vivo. *J Clin Invest* 1994, 94, 568-577.
- Fenton K.A., Rekvig O.P.: A central role of nucleosomes in lupus nephritis. *Ann N Y Sci Acad* 2007, 1108, 104-113.
- Zhao Z., Weinstein M., Tuzova M., Davidson A., Mundel P., Maramba P. i inni: Cross-reactivity of human lupus anti-DNA antibodies with alpha-actinin and nephritogenic potential. *Arthritis Rheum* 2005, 52, 522-530.
- Coritsidis G.N., Lombardo F., Rumore P., Kuo S.F., Izzo R., Mir R.: Nucleosome effect on mesangial cell matrix and proliferation: a possible role in early lupus nephritis. *Exp Nephrol* 2002, 10, 216-226.
- Jiang N., Reich C.F., Pisetsky D.S.: Role of macrophages in the generation of circulating blood nucleosomes from dead and dying cells. *Bood* 2003, 102, 2243-2250.
- Cocca B.A., Seal S.N., Agnillo P.D., Mueller Y.M., Katsikis P.D., Rauch J.: Structural basis for autoantibody recognition of phosphatidiloserine-beta2 glycoprotein 1 and apoptotic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98, 13826-13831.
- Muller S., Dieker J., Tincani A., Meroni P.L.: Pathogenic anti-nucleosome antibodies. *Lupus* 2008, 17, 431-436.
- Mortensen E.S., Rekvig O.P.: Nephritogenic potential of anti-DNA antibodies against necrotic nucleosomes. *J Am Nephrol* 2009, 20, 696-704.
- van Bruggen M.C.J., Kramers C., Walgreen B., Elema J.D., Kallenberg C.G., van den Born J. i inni: Nucleosomes and histones are present in glomerular deposits in human lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 1997, 12, 57-66.
- Amoura Z., Koutouzov S., Chabre H., Cacoub P., Amoura I., Musset L. i inni: Antinucleosome antibodies of the

- IgG3 subclass are markers of renal pathogenicity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2000, 43, 76-84.
27. **Min D.J., Kim S.J., Park S.H., Seo Y.I., Kang H.J., Kim W.U. i inni:** Anti-nucleosome antibody: significance in lupus patients lacking anti-double-stranded DNA antibody. *Clin Exp Rheumatol* 2002, 20, 13-18.
 28. **Bigler C., Lopez-Tracasa M., Potlukova E., Moll S., Danner D., Schaller M. i inni:** Antinucleosome antibodies as a marker of active proliferative lupus nephritis. *Am J Kidney Dis* 2008, 51, 624-629.
 29. **Pradhan V.D., Patwardhan M.M., Ghosh K.:** Anti-nucleosome antibodies as a disease marker in systemic lupus erythematosus and its correlation with disease activity and other autoantibodies. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2012, 76, 145-149.
 30. **Ravirajan C.T., Rowse L., MacGowan J.R., Isenberg D.:** An analysis of clinical disease activity and nephritis-associated serum autoantibody profiles in patients with systemic lupus erythematosus: a cross-sectional study. *Rheumatology* 2001, 40, 1405-1412.
 31. **Quattrocchi P., Barrile A., Bonanno A., Giannetto L., Patafi M., Tigano V. i inni:** The role of antinucleosome antibodies in systemic lupus erythematosus. Results of a study of patients with systemic lupus erythematosus and other connective tissue diseases. *Reumatismo* 2005, 57, 109-113.
 32. **Benucci M., Gobbi F.L., Del Rosso A., Cesaretti S., Niccoli L., Cantini F.:** Disease activity and antinucleosome antibodies in systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol* 2003, 32, 42-45.
 33. **Hung W.T., Chen Y.M., Lan J.L., Chen H.H., Chen Y.H., Chen D.Y. i inni:** Antinucleosome antibodies as a potential biomarker for the evaluation of renal pathological activity in patients with proliferative lupus nephritis. *Lupus* 2011, 20, 1404-1410.
 34. **Berden J.H., Licht R., van Bruggen M.C., Tax W.:** Role of nucleosomes for induction and glomerular binding of autoantibodies in lupus nephritis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1999, 8, 299-306.
 35. **Bruns A., Blass S., Hausdorf G.:** Nucleosomes are major T and B cell autoantigens in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2000, 43, 2307-2315.
 36. **Simon J.A., Cabiedes J., Ortiz E., Alcocer-Varela J., Sanchez-Guerrero J.:** Antinucleosome antibodies in patients with systemic lupus erythematosus of recent onset. Potential utility as a diagnostic tool and disease activity marker. *Rheumatology* 2004, 43, 220-224.
 37. **Düzgün N., Sahin M., Genç Y., Tutkak H.:** Anti-nucleosome antibodies and systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci* 2007, 1109, 421-428.
 38. **Cervera R., Vinas O., Ramos-Casals M., Front J., Garcia-Carrasco M., Siso A.:** Antichromatin antibodies in systemic lupus erythematosus: a useful marker for lupus nephropathy. *Ann Rheum Dis* 2003, 62, 431-434.
 39. **Gomez-Puerta J.A., Molina J.F., AnaYa J.M., Molina J.:** Clinical significance of antichromatin antibodies in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2001, 10, 73.
 40. **Su Y., Jia R.L., Han L., Li Z.G.:** Role of anti-nucleosome antibody in the diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol* 2007, 122, 115-20.
 41. **Haddouk S., Ben Ayed M., Baklouti S., Hachicha J., Bahloul Z., Masmoudi H.:** Clinical significance of anti-nucleosome antibodies in Tunisian systemic lupus erythematosus patients. *Clin Rheumatol* 2005, 24, 219-22.
 42. **Ghirardello A., Doria A., Zampieria S., Tarricone E., Tozzoli R., Villalta D. i inni:** Antinucleosome antibodies in SLE a two-year follow up study of 101 patients. *J Autoimmun* 2004, 22, 235-240.
 43. **Suleiman S., Kamaliah D., Nadeem A., Naing N.N., Che Maraina C.H.:** Anti-nucleosome antibodies as a disease activity marker in patients with systemic lupus erythematosus. *Int J Rheum Dis* 2009, 12, 100-106.
 44. **Grootscholten C., Diecker J.W., Mc Grath F.D., Roos A., Derksen R.H., van der Vlag J. i inni:** A prospective study of anti-chromatin and anti-C1q autoantibodies in patients with proliferative lupus nephritis treated with cyclophosphamide pulses or azathioprine/methylprednisolone. *Ann Rheum Dis* 2007, 66, 693-696.
 45. **Kang H.K., Michaels M.A., Berner B.R., Datta S.K.:** Very low-dose tolerance with nucleosomal peptides controls lupus and induces potent regulatory T cell subsets. *J Immunol* 2005, 174, 3247-3255.

Otrzymano: 26 X 2012 r.
Zaakceptowano: 29 XI 2012 r.