

# Wartość diagnostyczna przeciwciał przeciw nukleosomom w toczniu rumieniowatym układowym i innych chorobach tkanki łącznej

Diagnostic value of anti-nucleosome antibodies in systemic lupus erythematosus and other connective tissue diseases

Agnieszka Szewczyk, Zofia Kołacińska-Strasz, Wiesław Gliński

Katedra i Klinika Dermatologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w Warszawie  
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Wiesław Gliński

Przegl Dermatol 2009, 96, 309–317

## STRESZCZENIE

**SŁOWA KLUCZOWE:**  
nukleosomy, ANA, markery immunologiczne, wartość diagnostyczna.

**KEY WORDS:**  
nucleosomes, ANA, immunological markers, diagnostic value.

**Wprowadzenie.** Przeciwciała przeciwjądrowe są autoprzeciwciałami skierowanymi przeciwko różnym antygenom jądrowym i cytoplazmatycznym. Występują one u pacjentów z chorobami tkanki łącznej, a niektóre z nich są uznane za ich markery immunologiczne. Ostatnio pojawiły się doniesienia o dużym znaczeniu diagnostycznym i prognostycznym przeciwciał przeciw nukleosomom. Nukleosom jest jednostką chromatyny zbudowaną z histonów, którą oplata nić DNA. Nukleosomy uwalniane są w procesie apoptozy komórek. Opisano obecność przeciwciał przeciw nukleosomom w surowicach pacjentów z toczniem rumieniowatym układowym, *morphea*, twardziną układową, mieszaną chorobą tkanki łącznej, *dermatomyositis* oraz w pierwotnym zespole antyfosfolipidowym i u pacjentów leczonych inhibitorami TNF- $\alpha$ .

**Cel pracy.** Analiza przydatności diagnostycznej przeciwciał przeciw nukleosomom w chorobach tkanki łącznej ze szczególnym uwzględnieniem tocznia rumieniowatego układowego w korelacji z innymi przeciwciałami przeciwjądrowymi i obrazem klinicznym.

**Materiał i metodyka.** Zbadano 74 surowice pochodzące od pacjentów z różnymi chorobami tkanki łącznej: 25 z *morphea*, 19 z SLE, 13 z zespołem Sjögrena, 8 surowic z *polymyositis*, 12 ze *scleromyositis*, w których metodą immunofluorescencji pośredniej na komórkach HEP2 stwierdzono przeciwciała przeciwjądrowe. W celu jakościowego różnicowania przeciwciał zastosowano test EUROLINE (Euroimmun Medizinische Labordiagnostika Lübeck AG, Niemcy).

**Wyniki.** Przeciwciała przeciw nukleosomom wykryto w 7 z 19 surowic (37%) pochodzących od pacjentów z SLE oraz w 1 z 25 (4%) od pacjentów z *morphea*. W 5 z 7 przypadków SLE przeciwciałom przeciw nukleosomom towarzyszyły przeciwciała skierowane przeciw dsDNA i antygenowi Ro SS-A. U jednego pacjenta z SLE przeciwciała przeciw nukleosomom były jedynymi wykrytymi. U większości osób z tym schorzeniem z przeciwciałami przeciw nukleosomom były obecne zmiany nerkowe.

**Wnioski.** Przeprowadzone wstępne badania pozwalają przypuszczać, że przeciwciała przeciw nukleosomom mogą być wartościowym markerem immunologicznym w diagnostyce SLE i mogą korelować z rozwojem tocznia nerkowego.

**ADRES DO KORESPONDENCJI:**  
Agnieszka Szewczyk,  
Klinika Dermatologiczna  
Warszawskiego Uniwersytetu  
Medycznego  
ul. Koszykowa 82a,  
02-008 Warszawa  
e-mail: aszewczyk@mp.pl

## ABSTRACT

**Introduction.** Anti-nuclear antibodies are autoantibodies to many nuclear and cytoplasmic antigens. They are present in a proportion of patients with various connective tissue diseases (CTD) and some of them are regarded as their immunological markers. In recent years some reports on the diagnostic and prognostic value of anti-nucleosome antibodies have been published. Nucleosomes are part of chromatin, consisting of histones around which is wrapped a stretch of DNA. Nucleosomes are released in the process of cell apoptosis. Antibodies to nucleosomes have been found in sera of patients with: SLE, localized and systemic scleroderma, MCTD, and dermatomyositis, as well as in primary antiphospholipid syndrome and in patients treated with anti-TNF- $\alpha$  biologicals.

**Objective.** Analysis of the diagnostic value of anti-nucleosome antibodies in various CTD, especially in SLE, and their correlation with antinuclear antibodies of other specificities and clinical findings.

**Material and methods.** The material comprises 74 sera of patients with various CTD (25 - localized scleroderma, 19 - SLE, 13 - Sjögren's syndrome, 8 - polymyositis, 12 - scleromyositis), positive for antinuclear antibodies in the indirect immunofluorescence test on HEp2 cells. Detection of anti-nucleosome antibodies and identification of specificity of other ANA were performed using the EUROLINE test (Euroimmun Medizinische Labordiagnostika Lubeck AG, Germany).

**Results.** Antibodies to nucleosomes were found in 7 out of 19 (37%) sera of patients with SLE and in 1 of 25 sera (4%) of patients with localized scleroderma. In 5/7 cases of SLE anti-nucleosome antibodies coexisted with dsDNA and Ro antibodies. In one patient with SLE, anti-nucleosome antibodies were the only antibodies found. The majority of patients with SLE with anti-nucleosome antibodies have had renal involvement.

**Conclusions.** Our preliminary results allow us to suppose that antibodies to nucleosomes may be a valuable immunological marker of SLE, especially of lupus nephritis.

---

## WPROWADZENIE

U podłoża chorób tkanki łącznej (ang. *connective tissue disease* - CTD) leżą zaburzenia immunologiczne manifestujące się wytwarzaniem różnych autoprzeciwciał skierowanych m.in. przeciwko antygenom jądrowym i cytoplazmatycznym. Do technik serologicznych stosowanych do wykrywania przeciwciał przeciwjądrowych (ang. *antinuclear antibody* - ANA) zalicza się metodę pośredniej immunofluorescencji (ang. *indirect immunofluorescence* - IIF), metodę podwójnej immunodyfuzji (ang. *double immunodiffusion* - DID), metodę immunoblotu (IB), ELISA (ang. *enzyme linked immunosorbent assay*), Western Blot (WB) oraz metodę immunoprecypitacji (IP). Metoda immunofluorescencji pośredniej, w której używa się jako substratów antygenowych komórek Hep-2, charakteryzuje się wysoką czułością i specyficznością i uznana jest za „złoty standard” do wykrywania ANA. Jej uzupełnie-

niem są metody ELISA, immunodyfuzji, WB i immunoblot. Kombinacja testu skringowego (immunofluorescencja pośrednia) ze specyficznym testem potwierdzającym umożliwia pewną ocenę obecności ANA oraz ich identyfikację.

Przeciwciała przeciwjądrowe mają różną swoistość, mogą być skierowane przeciwko DNA, histonom oraz rozpuszczalnym antygenom jądrowym. Stwierdzenie ANA nie jest decydujące w ustaleniu rozpoznania, gdyż można je wykryć w różnych CTD, takich jak toczeń rumieniowaty układowy (ang. *systemic lupus erythematosus* - SLE), twardzina układowa, *dermatomyositis*, mieszana choroba tkanki łącznej (ang. *mixed connective tissue disease* - MCTD), w trakcie farmakoterapii niektórymi lekami (prokainamid, hydralazyna), w przypadkach przewlekłego aktywnego zapalenia wątroby, a także w małym odsetku u osób zdrowych.

Przeciwciała przeciwiądrowe, swoiste dla danej CTD, powszechnie uznaje się za jej immunologiczne markery, a ich występowanie ma znaczenie diagnostyczne i prognostyczne.

Toczeń rumieniowaty układowy jest ciężką chorobą autoimmunologiczną, dotyczącą skóry i narządów wewnętrznych, w której w 95% przypadków stwierdza się ANA o różnej swoistości (tab. I). Miana ANA zmniejszają się, a częstość ich wykrywania spada wraz ze zmniejszeniem aktywności choroby, bywa, że są one stwierdzane tylko w czasie jej zaostrzenia. Markerem immunologicznym SLE są przeciwciała skierowane przeciw natywnemu DNA (ang. *double stranded deoxyribonucleic acid* – dsDNA) i przeciw antygenowi Sm, jednak u około 25% pacjentów nie stwierdza się obydwu markerów.

W surowicach osób ze SLE stwierdza się niewielkie spektrum autoprzeciwciał, których rola patogenna nie zawsze jest znana. Przeciwciała skierowane przeciw antygenom, takim jak PCNA, Ku, HMG-17, ubikwitynie [1, 2], występują tylko u niewielkiego odsetka chorych na SLE, a także u pacjentów z innymi CTD. W SLE i zespołach antyfosfolipidowych spotyka się autoprzeciwciała skierowane przeciw aneksynie V (30%) i oxiLDL (30–40%) [2, 3]. Wykazano, że mają one bezpośredni wpływ na procesy patogenetyczne zachodzące w tych chorobach [2].

Objawy neurologiczne SLE próbuje się tłumaczyć obecnością przeciwciał przeciwn neuronalnych oraz skierowanym przeciwko komponentom neurocytów: mielinie (MAG), dekarboksylazie glutaminianowej (GAD), włóknom Purkiniego (Yo), oraz jądrum neuronów (Hu, Ri). Znaczenie tych przeciwciał dla zmian w ośrodkowym układzie nerwowym nie jest do końca poznane [2, 4].

Wiele objawów SLE, takich jak zapalenie naczyń skóry, objawy sercowo-naczyniowe, objawy neuro-

logiczne czy zmiany nerkowe, może wynikać z zaburzeń angiogenezy i uszkodzenia naczyń. W patogenezie tych ostatnich biorą udział autoprzeciwciała skierowane przeciw śródbłonkom (AECA) [5, 6].

Ostatnio pojawiły się doniesienia o dużym znaczeniu diagnostycznym i prognostycznym u pacjentów ze SLE autoprzeciwciał skierowanych przeciw nukleosomom [7–19].

Nukleosomy są zorganizowanymi podjednostkami chromosomów składającymi się z histonów (H1, H2A, H2B, H3 i H4) i dsDNA. Ich centrum złożone jest z tetrameru H3-H3-H4-H4, który z każdej strony otacza dimer H2A-H2B. Podwójna spirala DNA owinięta jest dookoła podjednostki histonów. Nukleosomy ułożone są w formie sznura koralu, a łańcuch DNA między nimi wiąże się z histonem H1, który znajduje się niejako na zewnątrz tej struktury (ryc. 1).

Nukleosomy są głównymi antygenami jądrowymi uwalnianymi w procesie apoptozy komórek. Obecność przeciwciał przeciwko nim skierowanych wykryto głównie u pacjentów z SLE. Stwierdzono, że są one wysoce specyficzne dla tej choroby, a częstość ich występowania mieści się według różnych autorów w przedziale od 50 do 100% [20]. W innych CTD – w twardzinie układowej, *morphea*, MCTD, *dermatomyositis* – były one obecne, ale w dużo mniejszym odsetku przypadków niż w SLE [8, 15]. Nie odnotowano ich obecności u ludzi zdrowych. Obecność przeciwciał przeciw nukleosomom wykazano także u pacjentów z pierwotnym zespołem antyfosfolipidowym (ang. *primary antiphospholipid syndrome* – APS) [21, 22]. U wielu pacjentów przeciwciała te występują we wczesnych stadiach choroby i mogą być, zdaniem Simona i wsp. [21], przydatnym markerem, zwłaszcza w przypadkach zespołów toczniopodobnych oraz u pacjentów z pierwotnym APS, u których w przeszłości rozwinie się SLE.

**Tabela I.** Charakterystyka najczęściej występujących ANA w SLE

**Table I.** Characteristics of the most common ANA in SLE

Antygen	Specyficzność
dsDNA (natywne dwuniciowe DNA)	wysoka specyficzność diagnostyczna w SLE (40%)
ssDNA (zdenaturowane, jednoniciowe DNA)	mała specyficzność diagnostyczna SLE (70%) występuje też w reumatoidalnym zapaleniu stawów – RZS (40%), mieszanej chorobie tkanki łącznej – MCTD (25%), u ludzi zdrowych
histony	SLE (20%), RZS (25%), toczeń polekowy (90%)
Sm	wysoka specyficzność diagnostyczna w SLE (20%)
U1RNP	marker MCTD (95%), SLE (30%), zapalenie mięśni, twardzina układowa (5%)
Ro(SSA)	zespół Sjögrena – SS (70%), SLE (30%)
La(SSB)	zespół Sjögrena – SS (60%), SLE (15%), podostry skóry toczень rumieniowaty układowy – SCLE, toczень rumieniowaty noworodków – NLE
rybosomalny P	wysoka specyficzność diagnostyczna w SLE (10%)

**Tabela II.** Wyniki testu Euroline w badanym materiale  
**Table II.** Result of Euroline test in studied series

EUROLINE								
Ro	La	dsDNA	RNP	Nukleosomy	Rybosomalne	Sm	PM-Scl	Jo-1
28	21	5	1	8	2	2	12	8

W ostatnich latach coraz więcej pacjentów jest leczonych inhibitorami TNF- $\alpha$  (adalimumab, etanercept, infliksymab) z powodu wielu chorób o podłożu autoimmunologicznym, głównie z powodu reumatoidalnego zapalenia stawów. Działania niepożądane tych leków obejmują większe ryzyko wystąpienia infekcji oraz indukcję autoprzeciwciał, takich jak ANA, anty-dsDNA i skierowanych przeciw nukleosomom [20]. Ericsson i wsp. [23] analizowali pojawianie się przeciwciał przeciw nukleosomom u 59 pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów leczonych inhibitorami TNF- $\alpha$  (53 leczonych infliksymabem, 6 – etanerceptem). W przypadku pacjentów otrzymujących infliksymab obserwowano zwiększenie częstości występowania przeciwciał przeciw nukleosomom wraz z czasem leczenia. W 54. tygodniu terapii stwierdzono je u 25% leczonych. U żadnego pacjenta przyjmującego etanercept nie wykryto przeciwciał przeciw nukleosomom [23]. W innym badaniu [24] ocenie poddano 91 pacjentów leczonych inhibitorami TNF- $\alpha$  (19 infliksymabem, 43 etanerceptem, 29 adalimumabem). W 24. tygodniu terapii 31% pacjentów otrzymujących infliksymab, 25% przyjmujących etanercept, 14% leczonych adali-

mumabem miało w surowicy przeciwciała skierowane przeciw nukleosomom [24]. Aringer i wsp. [25] analizowali profil autoprzeciwciał u pacjentów leczonych infliksymabem z powodu SLE. U 6 z 7 pacjentów odnotowano przejściowe zwiększenie miana przeciwciał przeciw nukleosomom, które – zdaniem autorów – nie ma znaczenia patologicznego.

## CEL PRACY

Celem pracy była wstępna analiza przydatności oznaczania przeciwciał przeciw nukleosomom w rozmaitych CTD, ze szczególnym uwzględnieniem SLE i ocena ich korelacji z innymi przeciwciałami przeciwdrobnymi i obrazem klinicznym.

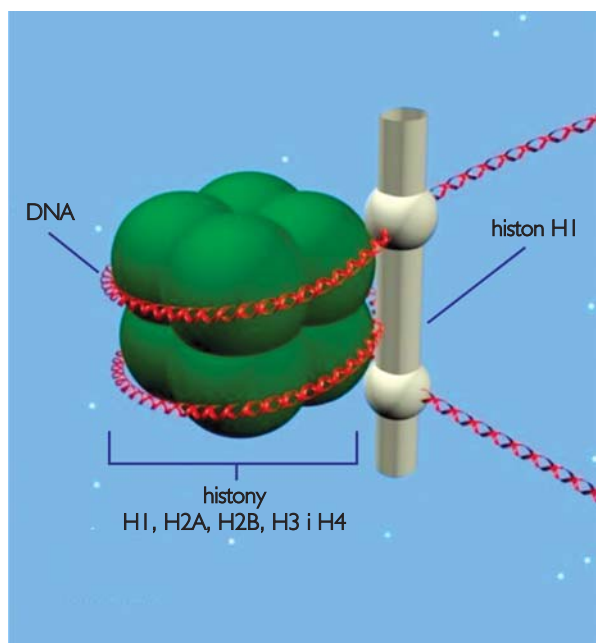
## MATERIAŁ I METODYKA

Materiał stanowiły 74 surowice pochodzące od 19 chorych na SLE, 25 z *morphea*, 13 z pierwotnym zespołem Sjögrena, 8 z *polymyositis* i 12 ze *scleromyositis*, w których stwierdzono ANA przy użyciu IIF. Do wykrywania i identyfikacji przeciwciał przeciw nukleosomom, a także ANA o innej swoistości zastosowano test Euroline II generacji firmy Euroimmun Medizinische Labordiagnostika Lúbeck, Niemcy, w którym na jednym pasku testowym znajdują się antygeny oczyszczone w chromatografii powinowactwa, a przeciwciała uwidacznia się w reakcji barwnej (ryc. 2.).

Surowice kontrolne pochodziły od 20 pacjentów z chorobami skóry spoza kręgu CTD.

## WYNIKI

Przeciwciała przeciw nukleosomom wykryto przy użyciu testu Euroimmun w 7 z 19 przypadków SLE (37%) oraz w 1 z 25 *morphea* (4%) (tab. II i III). W żadnej innej CTD nie stwierdzono przeciwciał przeciw nukleosomom. W SLE przeciwciała przeciw nukleosomom współwystępowały z ANA o innej swoistości, a u 1 chorego były jedynymi zidentyfikowanymi przeciwciałami (tab. IV). Analiza kliniczna wykazała, że przeciwciała przeciw nukleosomom były obecne u chorych na SLE ze zmianami nerkowymi.



**Ryc. 1.** Struktura nukleosomu

**Fig. 1.** Structure of nucleosome



## OMÓWIENIE

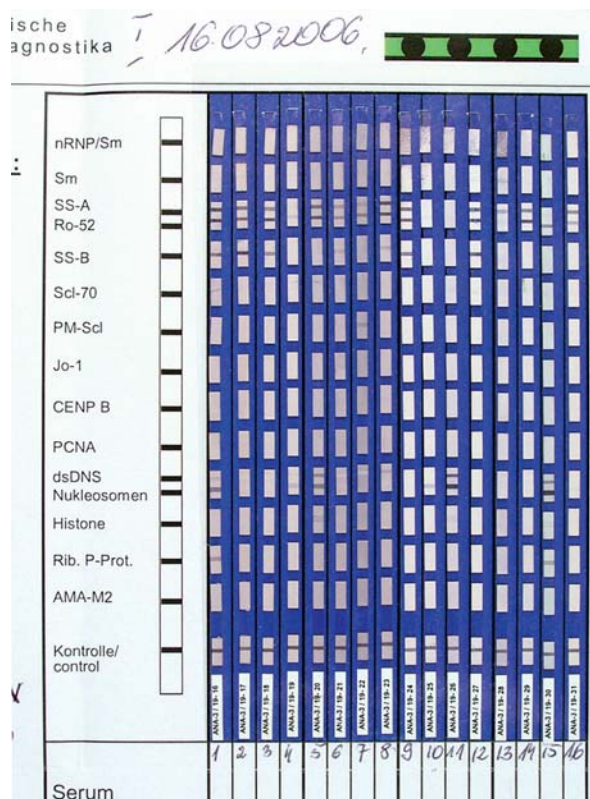
Toczeń rumieniowaty układowy jest interdyscyplinarną chorobą autoimmunologiczną. Chociaż znany od wielu lat, wciąż wiele zachodzących w nim procesów patologicznych jest niewyjaśnionych. Na świecie ciągle trwają badania nad nowymi, bardziej specyficznymi i czułymi metodami diagnostyki, monitorowaniem przebiegu i leczeniem tej choroby.

Wiele danych wskazuje na to, że przeciwciała przeciw nukleosomom są czułym i specyficznym markerem SLE [16, 18]. Obecność przeciwciał przeciw nukleosomom w klasie IgG, a zwłaszcza w klasie IgG3, może być nowym markerem, szczególnie SLE, a zwłaszcza tocznia nerkowego. Zdaniem niektórych autorów, przeciwciała przeciw nukleosomom mogą być bardziej czułym markerem SLE niż przeciwciała przeciwko dsDNA [8]. Stosując testy Euroimmun II generacji, stwierdzono je nie tylko u pacjentów z aktywną postacią choroby, ale także w przypadkach nieaktywnych, w których nie występowały przeciwciała dsDNA [8]. Wiele danych wskazuje ponadto na to, że przeciwciała przeciw nukleosomom pojawiają się w surowicy chorych na SLE bardzo wcześnie, zanim pojawią się inne markery, takie jak przeciwciała anty-dsDNA [11]. W innych badaniach nie wykazano większej koncentracji przeciwciał przeciw nukleosomom w surowicach pobranych od pacjentów z III i IV klasą *lupus nephritis* w porównaniu z pacjentami z tzw. *inactive lupus*, natomiast przeciwciała anty-dsDNA były obecne w znacznie większym mianie w przypadkach *lupus nephritis* niż w tzw. *inactive SLE* [26].

Uważa się, że zarówno przeciwciała przeciw dsDNA, jak i przeciw nukleosomom mogą mieć znaczenie patogenetyczne w toczniu układowym [11–13]. Według wielu badaczy poziom przeciwciał przeciw nukleosomom koreluje z poziomem przeciwciał anty-dsDNA [15–17, 19], ale są także przypadki, w których stwierdza się przeciwciała przeciw nukleosomom przy braku przeciwciał anty-dsDNA [13, 15–17, 27–29]. Dane te wskazują, że przeciwciała przeciw nukleosomom mogą być pomocne diagnostycznie w tych przypadkach SLE, w których nie występują przeciwciała anty-dsDNA.

W wielu pracach podkreśla się związek między obecnością przeciwciał przeciw nukleosomom i zajęciem nerek [8, 13, 15–18] oraz – w mniejszym stopniu – ze zmianami hematologicznymi [16, 19], zapaleniem stawów, opłucnej i zmianami skórnymi [18]. Zaobserwowano dodatnią korelację między obecnością przeciwciał przeciw nukleosomom a SLEDAI (ang. *SLE disease activity index*). Również w materiale autorów niniejszej pracy przeciwciała przeciw nukleosomom stwierdzono u tych osób z SLE, u których w przebiegu choroby obserwowano objawy *lupus nephritis*.

Zmiany nerkowe są jednymi z najpoważniejszych objawów SLE. Kompleksy immunologiczne odkładają się w kłębuszkach nerkowych (podśródbłonkowo, podnabłonkowo, w mezangium, wzdłuż błon podstawnych cewek nerkowych, w ścianach tętniczek wewnątrznerkowych), prowadząc do rozwoju



Ryc. 2. Test Euroline

Fig. 2. The Euroline test

Tabela III. Częstość wykrywania przeciwciał przeciw nukleosomom w CTD

Table III. Frequency of detection of anti-nucleosome antibodies in patients with various CTD

Rozpoznanie	Przeciwciała przeciw nukleosomom
SLE	7/19
<i>morphea</i>	1/25
zespół Sjögrena	0/13
<i>polymyositis</i>	0/8
<i>scleromyositis</i>	0/12

Tabela IV. Współwystępowanie przeciwciał przeciw nukleosomom z innymi autoprzeciwciałami w SLE

Table IV. SLE. Coexistence of anti-nucleosome antibodies with ANA of other specificities

Przeciwciała/ /nukleosom	dsDNA	Ro	Ro+ dsDNA	Brak przeciwciał
7	1	1	4	1

stanu zapalnego oraz destrukcji mięszu nerki. Objawy nefropatii toczniowej występują u 30–80% pacjentów ze 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 SLE. Kompleksy immunologiczne odkładające się w postaci złogów odgrywają kluczową rolę w rozwoju tocznia nerkowego [30]. Fragmenty chromatyny zawarte w tych kompleksach mogą być zarówno czynnikiem wywołującym, jak i celem dla przeciwciał skierowanych przeciw dsDNA i nukleosomom [30].

N-terminalne obszary rdzenia histonowego położone na zewnątrz nukleosomu mają silnie dodatni ładunek elektryczny, co sprzyja wiązaniu z ujemnie naładowanymi determinantami (siarczan heparanu, reszty anionowe) błony podstawnej kłębka nerkowego [31]. Zmniejszenie transkrypcji i aktywności nerkowej DNA-azy i nukleazy powoduje redukcję fragmentacji i usuwania fragmentów chromatyny. Fragmenty te wiążą się z wysokim powinowactwem z błoną kłębuszków nerkowych i stymulują układ odpornościowy, m.in. przez receptory *toll-like* do produkcji przeciwciał [30]. Według niektórych autorów wszechobecne nukleosomy są podstawowym autoantygenem w SLE odpowiedzialnym za produkcję wielu autoprzeciwciał przeciwjądrowych [32, 33]. Związane z błoną kłębuszka nerkowego depozyty zawierające apoptotyczne nukleosomy wydają się celem dla autoprzeciwciał [34]. Nukleosomy stwierdzono w kłębuszkowych depozytach u pacjentów z toczniem nerkowym i uzyskiwano z eluatów kłębuszkowych [35]. Opisano, że same nukleosomy mają znaczenie patogenne – mogą indukować sekrecję interleukiny 6, hamować fagocytozę i wpływać na funkcję komórek mezangium kłębuszka nerkowego [36].

Wielu badaczy zadaje sobie pytanie, na czym polega patogenność nukleosomów i przeciwciał przeciw nim skierowanych. W SLE dochodzi do upośledzonego usuwania apoptotycznych pęcherzyków, które są źródłem nukleosomów. Defekt ten obserwuje się zarówno u ludzi, jak i u myszy z toczniem [37]. Wykazano, że w toczniu dochodzi do wielu defektów regulatorowych zarówno w komórkach Th, jak i w komórkach B dotyczących np. interakcji ligandu CD40-CD40, które skutkują przedłużeniem sygnału kostymulatorowego dla komórek B i prawdopodobnie wpływają na wzrost zdolności komórek prezentujących antygen do prezentacji komórek apoptotycznych limfocytom T [38]. Wydaje się, że jedną z dróg działania przeciwciał przeciw nukleosomom (pierwotnie opisaną dla przeciwciał anti-dsDNA) jest bezpośredni efekt ich penetracji do komórki, jej cytoplazmy i jądra komórkowego, gdzie

mogą indukować apoptozę [39], wpływać na ekspresję genów [40], modulować translację poprzez wiązanie się z czynnikiem EF2 (ang. *elongation factor*) [41]. Sposób wejścia do komórki jest nieznan, chociaż potencjalnym receptorem może być miozyna 1 [27, 29]. Zmiana ekspresji genów może być też spowodowana przyłączeniem się przeciwciał do sygnalizacyjnego receptora błonowego [40–43]. Drugą drogą jest wiązanie przeciwciał do apoptotycznych pęcherzyków, co powoduje opsonizację tych cząsteczek. Nukleosomy są eksponowane na zewnątrz apoptotycznych pęcherzyków [42, 44]. Przeciwciała przeciw nukleosomom mogą wiązać się z epitopami dostępnymi na nukleosomach obecnych na pęcherzykach apoptotycznych, które są uwalniane z późnych komórek apoptotycznych. Prowadzi to do zależnej od FcγR fagocytozy przez komórki dendrytyczne i makrofagi [45]. U pacjentów z SLE może dochodzić do znaczącego zahamowania fagocytozy komórek apoptotycznych przez pochodzące z monocytów makrofagi po opsonizacji komórek apoptotycznych przez frakcję IgG, natomiast efektu takiego nie obserwowano w zdrowej grupie kontrolnej [42]. Po uwolnieniu nukleosomów z późnych komórek apoptotycznych, w przypadkach, w których upośledzone jest ich usuwanie, dochodzi do powstania kompleksów przeciwciał skierowanych przeciw nukleosomom i nukleosomów. Kompleksy te mogą aktywować komórki B poprzez synergiczne zaangażowanie receptora dla antygeny i *toll-like* receptora 9 (TLR9) [42, 46]. Mogą one także aktywować komórki dendrytyczne zarówno przez podwójne zaangażowanie receptora FcγRIII i TLR9, jak i drogą niezależną od TLR9 [47].

Inną patogenną drogą działania kompleksów immunologicznych złożonych z przeciwciał przeciw nukleosomom i nukleosomów może być wiązanie się ich z błoną podstawną w skórze i nerkach, np. za pośrednictwem cząsteczek, takich jak siarczan heparanu, laminina lub kolagen IV, albo przez bezpośrednie wiązanie przeciwciał z krzyżowo reagującymi cząsteczkami (np. α-aktynina). W badaniach w mikroskopie elektronowym wykazano, że przeciwciała przeciw nukleosomom współwystępują prawie wyłącznie z fragmentami apoptotycznej chromatyny w kłębuszkach nerkowych myszy i ludzi z toczniem [34, 42, 48, 49].

Przeciwciała przeciw nukleosomom były także badane u dzieci ze SLE. Campos i wsp. [50] badali obecność tych przeciwciał u 74 brazylijskich dzieci z toczniem (średnia wieku 14 lat). U 52% z nich stwierdzono występowanie przeciwciał przeciw nukleosomom. U dzieci tych odnotowano dodatnią korelację ze zmianami skórными, zaburzeniami hematologicznymi i zmniejszonym poziomem komplementu. Dodatkowo stwierdzono, że zredukowany poziom komple-

mentu częściej występował u dzieci z dodatnimi przeciwciałami przeciw nukleosomom niż z przeciwciałami anty-dsDNA. Zaobserwowano znaczący związek między występowaniem przeciwciał przeciw nukleosomom a SLEDAI i brak związku z zajęciem nerek. Na tym materiale nie zaobserwowano także związku przeciwciał anty-dsDNA ze zmianami nerkowymi [50].

Obecność przeciwciał przeciw nukleosomom stwierdzono również w twardzinie. Według Sato i wsp. [51] w twardzinie ograniczonej (ang. *localized scleroderma* – LSc) występują przeciwciała przeciw nukleosomom w klasie IgG w znacznie większym mianie niż w grupie kontrolnej, ale w znacznie mniejszym niż w SLE. Największe miana przeciwciał przeciw nukleosomom stwierdzono w *morphea generalisata* i *sclerodermia linearis*, natomiast miana mniejsze obserwowano u pacjentów z *morphea*. Z badań innych autorów wynikała duża czułość i swoistość przeciwciał przeciwko nukleosomom dla chorób z kręgu twardziny [9, 10]. Przyczyną tych rozbieżności mogły być różne metody przygotowywania używanych do testów nukleosomów oraz ustalony poziom odcięcia (*cut-off*) ich miana. W przypadku zastosowania poziomu odcięcia od 10 U/ml [19] przeciwciała przeciw nukleosomom były obecne u 22,8% pacjentów z twardziną. Po użyciu tego samego testu komercyjnego i ustaleniu poziomu odcięcia od 20 U/ml przeciwciała przeciw nukleosomom w twardzinie stwierdzono jednak u 1,8% pacjentów [19].

Zastosowanie nowatorsko oczyszczonych mononukleosomów w testach II generacji, wolnych od H1, scl70 (topoizomerazy I DNA) i innych białek niehistonowych wykazało dużą ich czułość (64,2%) i swoistość (98,8%) dla SLE [52]. W materiale autorów przeciwciała przeciw nukleosomom były obecne tylko w 1 z 25 badanych przypadków *morphea* i był to przypadek twardziny liniowej. Należy podkreślić, że w badaniach własnych posługiwano się testem Euroimmun II generacji.

Rozwój badań nad nukleosomami i patomechanizmami z nimi związanymi pozwolił na opracowanie nowych metod 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 B [53]. Uzyskane wyniki są bardzo obiecujące – zmniejsza się poziom autoprzeciwciał, opóźnia się rozwój powikłań nerkowych, wpływa się na regulację limfocytów T. Możliwe, że w przyszłości podobne terapie będą mogły być stosowane u ludzi.

## PODSUMOWANIE

Nukleosomy uwalniane są w procesie apoptozy komórek, a defekt ich usuwania drogą fagocytozy prowadzi do nadmiernej stymulacji układu immunologicznego i produkcji przeciwciał przeciw nim skierowanych. Przeciwciała te pojawiają się w surowicy wcześniej niż inne autoprzeciwciała lub mogą występować jako jedyne. Wraz z innymi przeciwciałami (np. dsDNA) lub niezależnie od nich mogą być bardzo pomocne w diagnostyce SLE. Konieczne są dalsze badania, które pozwolą na ustalenie znaczenia nukleosomów i przeciwciał przeciw nim skierowanych w rozpoznawaniu SLE.

## Piśmiennictwo

1. von Muhlen C.A., Tan E.M.: Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum* 1995, 24, 323-358.
2. Ząbek J.: Celowość oznaczania surowiczych autoprzeciwciał niezaliczanych do kryteriów diagnostycznych układowych chorób tkanki łącznej. *Reumatologia* 2006, 44, 343-348.
3. Ząbek J., Wojciechowska B., Alekberova Z.: Przeciwciała dla aneksyny V jako nowy wskaźnik ryzyka zakrzepic i poronień w toczniu rumieniowatym układowym (SLE) oraz w zespole antyfosfolipidowym pierwotnym (PAPS) i wtórnym (SAPS). *Reumatologia* 2003, 41, 12-24.
4. Meyer W., Schneider B., Klotz M.: EUROLINE anti-ganglioside profile: a new membrane test for detection of antibodies against gangliosides. 5th Dresden Symposium on Autoantibodies. Dresden, Germany, October 2002.
5. D'Cruz D.: Vasculitis in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1998, 7, 270-274.
6. Vepaatalo H., Mervaala E.: Clinically important factors influencing endothelial function. *Med Sci Monit* 2001, 7, 1075-1085.
7. Sherer Y., Gorstein A., Fritzler M.J., Shoenfeld Y.: Autoantibody explosion in systemic lupus erythematosus: more than 100 different antibodies found in SLE patients. *Semin Arthritis Rheum* 2004, 34, 501-537.
8. Amoura Z., Koutouzov S., Chabre H., Cacoub P., Amoura I., Musset L. i inni: Antinukleosome antibodies of the IgG3 subclass are markers of renal pathogenicity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2000, 43, 76-84.
9. Wallace D.J., Lin H.C., Shen G.Q., Peter J.B.: 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.
10. Rubin R.L., Beli S.A., Burlingame R.W.: Autoantibodies associated with lupus induced by diverse drugs target a similar epitope in the (H2A-H2B)-DNA complex. *J Clin Invest* 1992, 90, 165-173.
11. 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.
12. Kramers C., Hylkema M.N., vanBruggen M.C., van de Lagemaat R., Dijkman H.B., Assmann K.J. i inni: Anti-



- nucleosome 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.
13. **Burlingame R.W., Boey M.L., Starkebaum G., Rubin R.L.:** The central role of chromatin in autoimmune responses to histones and DNA in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1994, 94, 184-192.
  14. **Chabre H., Amoura Z., Piette J.C., Godeau P., Bach J.F., Koutouzov S.:** Presence of nucleosome restricted antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1995, 38, 1485-1491.
  15. **Cervera R., Vinas O., Ramos-Casals M., Font 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.
  16. **Cairns P.A., McMillan S.A., Crockard A.D., Meenagh G.K., Duffy E.M., Armstrong D.J. i inni:** Antinucleosome antibodies in the diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2003, 62, 272-273.
  17. **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.
  18. **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.
  19. **Ghirardello A., Doria A., Zampieri 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.
  20. **Gomez-Puerta J.A., Burlingame R.W., Cervera R.:** Anti-chromatin (anti-nucleosome) antibodies: diagnostic and clinical value. *Autoimmun Rev* 2008, 7, 606-611.
  21. **Abraham Simon J.A., 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.
  22. **Andreoli L., Pregnotato F., Burlingame R.W., Allegrì F., Rizzini S., Fanelli I i inni:** Antinucleosome antibodies in primary antiphospholipid syndrome: a hint at systemic autoimmunity? *J Autoimmun* 2008, 30, 51-57.
  23. **Eriksson C., Engstrand S., Sundqvist K.G., Ranta paa-Dahlqvist S.:** Autoantibody formation in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNFalpha. *Ann Rheum Dis* 2005, 64, 403-407.
  24. **Benucci M., Saviola G., Baiardi P., Cammeli E., Manfredi M.:** Antinucleosome antibodies as prediction factor of development of autoantibodies during therapy with three different TNF alpha blocking agents in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2008, 27, 91-95.
  25. **Aringer M., Steiner G., Graninger W.B., Hofler E., Steiner C.W., Smolen J.S.:** Effects of short-term infliximab therapy on autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2007, 56, 274-279.
  26. **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.
  27. **Gómez-Puerta J.A., Molina J.F., AnaYa J.M., Molina J.:** Clinical significance of antichromatin antibodies in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2001, 10, 73.
  28. **Braun A., Sis J., Max R., Mueller K., Fiehn C., Zeier M. i inni:** Anti-chromatin and anti -C1q antibodies in systemic lupus erythematosus compared to other systemic autoimmune diseases. *Scand J Rheumatol* 2007, 36, 291-298.
  29. **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, 115-120.
  30. **Mortensen E.S., Rekvig O.P.:** Nephritogenic potential of anti-DNA antibodies against necrotic nucleosomes. *J Am Soc Nephrol* 2009, 20, 696-704.
  31. **Berden J.H.:** Lupus nephritis. *Kidney Int* 1997, 52, 538-558.
  32. **Amoura Z., Piette J.C., Bach J.F., Koutouzov S.:** The key role of nucleosomes in lupus. *Arthritis Rheum* 1999, 42, 833-834.
  33. **Bruns A., Blass S., Hausdorf G., Burmester G.R., Hiepe F.:** Nucleosomes are major T and B cell autoantigens in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2000, 43, 2307-2315.
  34. **Kalaaji M., Fenton K.A., Mortensen E.S., Olsen R., Sturfelt G., Alm P. i inni:** Glomerular apoptotic nucleosomes are central target structures for nephritogenic antibodies in human SLE nephritis. *Kidney Int* 2007, 71, 664-672.
  35. **van Bruggen M.C., 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.
  36. **Coritsidis G.N., Lombardo F., Rumore P., Kuo S.F., Izzo R., Mir R. i inni:** Nucleosome effect on mesangial cell matrix and proliferation: a possible role in early lupus nephritis. *Exp Nephrol* 2002, 10, 216-226.
  37. **Bijl M., Reefman E., Horst G., Limburg P.C., Kallenberg G.C.:** Reduced uptake of apoptotic cells by macrophages in systemic lupus erythematosus; correlates with decreased serum levels of complement. *Ann Rheum Dis* 2006, 65, 57-63.
  38. **Datta S.K., Zhang L., Xu L.:** T-helper cell intrinsic defects in lupus that break peripheral tolerance to nuclear autoantigens. *J Mol Med* 2005, 83, 267-278.
  39. **Rivadeneira-Espinoza L., Ruiz-Arguelles A.:** Cell-penetrating antinative DNA antibodies trigger apoptosis through both the neglect and programmed pathways. *J Autoimmun* 2006, 26, 52-56.
  40. **Yanase K., Madaio M.P.:** Nuclear localizing anti-DNA antibodies enter cells via caveoli and modulate expression of caveolin and p53. *J Autoimmun* 2005, 24, 145-151.
  41. **Alberdi F., Dadone J., Ryazanov A., Isenberg D.A., Ravirajan C., Reichlin M.:** Cross-reaction of lupus anti-dsDNA antibodies with protein translation factor EF-2. *Clin Immunol* 2001, 98, 293-300.
  42. **Muller S., Dieker J., Tincani A., Meroni P.L.:** Pathogenic anti-nucleosome antibodies. *Lupus* 2008, 17, 431-436.
  43. **Qing X., Zavadil J., Crosby M.B., Hogarth M.P., Hanh B.H., Mohan C. i inni:** Nephritogenic anti-DNA antibodies regulate gene expression in MRL/lpr mouse glomerular mesangial cells. *Arthritis Rheum* 2006, 54, 2198-2210.
  44. **Radic M., Marion T., Monestier M.:** Nucleosomes are exposed at the cell surface in apoptosis. *J Immunol* 2004, 172, 6692-6700.
  45. **Sarmiento L.F., Munoz L.E., Chirinos P., Bianco N.E., Zabaleta-Lanz M.E.:** Oponisation by anti-dsDNA antibodies of apoptotic cells in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 2007, 40, 337-339.
  46. **Herlands R.A., William J., Hershberg U., Shlomchik M.J.:** Antichromatin antibodies drive in vivo antigen-specific activation and somatic hypermutation of rheumatoid factor B cells at extrafollicular sites. *Eur J Immunol* 2007, 37, 3339-3351.



47. **Boule M.W., Broughton C., Mackay F., Akira S., Marshak-Rothstein A., Rifkin I.R.:** Toll-like receptor 9-dependent and independent dendritic cell activation by chromatin-immunoglobulin G complexes. *J Exp Med* 2004, 199, 1631-1640.
48. **Kalaaji M., Mortensen E., Jorgensen L., Olsen R., Rekvig O.P.:** Nephritogenic lupus antibodies recognize glomerular basement membrane-associated chromatin fragments released from apoptotic intraglomerular cells. *Am J Patol* 2006, 168, 1779-1792.
49. **Mjelle J.E., Rekvig O.P., Fenton K.A.:** Nucleosomes possess a high affinity for glomerular laminin and collagen IV and bind nephritogenic antibodies in murine lupus-like nephritis. *Ann Rheum Dis* 2007, 66, 1661-1668.
50. **Campos L.M., Kiss M.H., Scheinberg M.A., Manguiera C.L., Silva C.A.:** Antinucleosome antibodies in patients with juvenile systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2006, 15, 496-500.
51. **Sato S., Kodera M., Hasegawa M., Fujimoto M., Takehara K.:** Antinucleosome antibody is a major autoantibody in localized scleroderma. *Br J Dermatol* 2004, 151, 1182-1188.
52. **Schutter B., Kaucikaite L., Schotte H.:** The diagnostic value of antinucleosome antibody testing in systemic lupus erythematosus. Comparison of 1st and 2nd generation ELISA. *J LabMed* 2002, 26, 516.
53. **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:** 24 VIII 2009 r.

**Zaakceptowano:** 21 IX 2009 r.