



KLINIČKI ZNAČAJ I METODE ZA ODREĐIVANJE ANTINUKLEUSNIH ANTITELA

ANTINUCLEAR ANTIBODIES: DETERMINATION AND CLINICAL RELEVANCE

Svetlana Kašiković Lečić¹, Aleksandar Kerenji², Eva Goldman¹, Jelka Orlović¹

¹ Institut za plućne bolesti, Sremska Kamenica

² Institut za onkologiju, Sremska Kamenica

SAŽETAK

Struktura ćelijskog jedra je vrlo složena. Njeno poznavanje je značajno jer pod određenim okolnostima antigeni jedra mogu da podstaknu imunski sistem čoveka na produkciju antinukleusnih antitela (ANA). ANA se najčešće detektuju u serumima obolelih od sistemskih bolesti vezivnog tkiva (SBVT), ali i u mnogim drugim bolestima i stanjima, pa čak i kod zdravih osoba, što zavisi često od metode kojom se izvodi test. U bolestima koje ne spadaju u SBVT, ANA su u serumima uglavnom prisutna u malom titru, a njihovo prisustvo je bez kliničkog značaja. Danas je zahvaljujući razvoju brojnih i vrlo osetljivih specifičnih metoda, moguće u serumima ispitanika pored ukupnih (tANA) odrediti i različite podgrupe ANA, tj. specifična ANA (sANA), karakteristična za pojedine antigene jedra. Selektivna pojava pojedinih sANA u određenih SBVT koristi se u dijagnostičke svrhe, za procenu težine bolesti, za praćenje efekata primenjene terapije i za prognozu bolesti. U Institutu za plućne bolesti u Sremskoj Kamenici koristi se tehnika indirektno imunofluorescencije (TIIF) za dokazivanje prisustva ANA u serumima ispitanika. Korišćenjem tkivnog ili ćelijskog supstrata, (a u slučaju pozitivnih rezultata), na fluorescentnom mikroskopu je moguće razlikovati 4 tipa jedarne fluorescencije.

Ključne reči: antinukleusna antitela, tip jedarne fluorescencije

SUMMARY

The cell nucleus has a very complex structure which is important to be known very well, as the nuclear antigens can, in certain circumstances, stimulate the human immunological system to produce antinuclear antibodies (ANA). ANA are usually detected in the serum of patients with systemic connective tissue disorders (SCTD), but in other conditions as well, even in healthy subjects. In the diseases other than SCTD, the serum is commonly presented with a low ANA titer, lacking any clinical symptoms. Due to the development of numerous exceptionally sensitive specific tests, it is nowadays possible to detect in the patient's serum both the total (tANA) and specific (sANA) antinuclear antibodies, specific for certain nuclear antigens. The selective emergence of some ANA in specific SCTD is utilized for diagnostic purposes, as well as for disease assessment, treatment monitoring and prognosis. To confirm the presence of ANA in the patient's serum, the technique of indirect immunofluorescence has been routinely applied in the Institute for Pulmonary Diseases in Sremska Kamenica. Using the tissue or cellular substrate (in case of a positive finding), four nuclear fluorescence types can be differentiated by fluorescent microscope.

Key words: antinuclear antibodies, nuclear fluorescence types.

ANTINUKLEUSNA ANTITELA

Jedarni antigeni su konstitutivni elementi ćelijskog jedra. Heterogeni su u pogledu fizičko-hemijskih svojstava. Izvestan broj jedarnih antigena je tačno lociran u okviru određenih strukturnih komponenti jedra. Najznačajniji jedarni antigeni su: nukleinske kiseline, bazni jedarni proteini-histoni i nehistski proteini jedra (1). Poznavanje strukture ćelijskog jedra i jedarnih antigena je značajno, jer pod određenim okolnostima antigeni jedra mogu da podstaknu imunski sistem čoveka na produkciju antinukleusnih antitela (ANA) tj. antitela koja se vezuju za antigene ćelijskog jedra.

Antinukleusna antitela su najpre otkrivena u serumima bolesnika sa sistemskim eritemskim lupusom (SEL). U početku se govorilo o totalnim ANA (tANA), pošto raspoloživa metodologija nije dopuštala identifikaciju njihovih podgrupa. Ona (tANA) ne ukazuju na antigensku specifičnost potvrđenih antitela. Zahvaljujući razvoju brojnih i vrlo osetljivih specifičnih metoda, moguće je odrediti i različite podgrupe ANA, tj. specifična ANA (sANA), karakteristična za pojedine antigene jedra (2,3).

ANA ispoljavaju izotipsku heterogenost i mogu pripadati bilo kojoj klasi imunoglobulina. Utvrđeno je da tANA najčešće pripadaju klasama IgG, IgM i IgA bilo da se u jednom serumu nalazi samo tANA jedne od ovih klasa, bilo da postoje istovremeno, u različitim kombinacijama. Kasnije su dokazana i tANA klase IgE i klase IgD (4). Određivanje klasa imunoglobulina kojima tANA pripadaju danas ima samo orijentacioni značaj, jer je neophodnije određivanje sANA, jer su ona specifična za pojedine antigene jedra, tj. za pojedine bolesti.

**ZNAČAJ DETEKCIJE
ANTINUKLEUSNIH ANTITELA**

Imunološko testiranje bolesnika pri sumnji na neku SBVT, započinje određivanjem prisustva tANA u serumu, kao i njihovog titra, a nastavlja se dokazivanjem pojedinih sANA, kao specifičnijih za pojedine bolesti. Selektivna pojava nekih sANA u određenih SBVT koristi se u dijagnostičke svrhe, za procenu težine bolesti, za praćenje efekata primenjene terapije i za prognozu bolesti.

Klinička osetljivost tANA, kao pokazatelja pri dijagnostici SEL je velika. Opšte je prihvaćeno gledište o znatno većim titrovima tANA u SEL u

poređenju sa drugim bolestima. Veći titar tANA u SEL je u korelaciji sa većom aktivnošću bolesti, dok u remisijama titar pada. Sa druge strane, shvaćeno je da negativan rezultat testa za tANA bitno doprinosi isključenju dijagnoze SEL (5).

Klinička specifičnost tANA u bolesnika sa SEL nije velika (5,6). To je zbog toga što se tANA mogu otkriti i u serumima (7):

- 1) Obolelih od drugih SBVT;
- 2) Bolestima jetre: hronični aktivni hepatitis, progresivna bilijarna ciroza, ostale bolesti jetre;
- 3) Bolestima respiratornih organa: fibrozirajućem alveolitisu, silikozi, pneumokoniozama, primarnoj fibrozi pluća, hroničnom bronhitisu i astmi;
- 4) Različitim infekcijama: infektivnoj mononukleozi, virusnom hepatitisu, tuberkulozi pluća, lepri, luesu, malariji;
- 5) Alergijama: na lekove, teškoj urtikariji;
- 6) U disproteinemijama;
- 7) U raznim tumorima: limfomi, kacinomi, hipernefrom
- 8) U drugim bolestima: uveitisu, autoimunom tireoiditisu, ulceroznom kolitisu, autoimunoj hemoliznoj anemiji, miastenii gravis, rekurentnom tromboflebitisu, pernicioznoj anemiji, psorijazi i u postoperativnim stanjima;
- 9) Kod zdravih osoba.

U bolestima koje ne spadaju u SBVT pojava tANA (uglavnom u malom titru) predstavlja samo epifenomen nastao usled reakcije imunskog sistema na oslobađanje jedarnih antigena iz lediranih tkiva, ili kao rezultat poremećaja imunskog odgovora svojstvenog odgovarajućoj bolesti, tako da je njihov nalaz bez kliničkog značaja (1).

ANA se mogu detektovati i u serumima zdravih starijih osoba. Kod njih se ova *prirodna* autoantitela mogu javiti kao posledica oslobađanja *zabranjenih* klonova (8) i autoantigena (npr. DNK) u virusnim, bakterijskim i parazitarnim infekcijama (9), kao i poliklonskom aktivacijom autoreaktivnih B limfocita. Prirodna autoantitela predstavljaju deo fizioloških mehanizama za čišćenje organizma od sopstvenih i stranih produkata (10). Ona deluju kao filter koji štiti autoantigene od uticaja snažnog imunskog odgovora izazvanog unakrsnim *cross* reaktivnim antitelima na infekciju organizma, a takođe mogu predstavljati i deo mreže idiotip-anti-idiotip.

U serumima zdravih osoba moguće je otkriti

prisustvo ANA (11). Titar tANA je kod takvih osoba po pravilu nizak. Nalaz tANA kod zdravih osoba uglavnom nema klinički značaj. Međutim, takav nalaz obavezuje kliničara na opreznost, pri čemu je neophodno ponavljanje testiranja i razmatranje mogućnosti postojanja ma kojeg od stanja za koja je poznato da ih može pratiti pojava ANA (2,3).

Poznato je da mnogi lekovi (prokainamid, hidralazin, hlorpromazin, izoniazid, sulfonamidi, metildopa, aspirin, interferon- γ i dr.) mogu da izazovu pojavu ANA kod osoba koje ih uzimaju, a kod nekih od njih se može pojaviti i medikamentozni lupus (2,12).

METODE ZA DOKAZIVANJE ANA U SERUMIMA

Tehnika indirektno imunofluorescencije (TIIF) se koristi u rutinskoj kliničkoj praksi za dokazivanje prisustva autoantitela u serumima ispitanika i predstavlja samo orijentacionu *screening* metodu, tj. samo prvi korak u dijagnostikovanju SBVT. TIIF se odvija u dve faze. U prvoj fazi dolazi do specifičnog vezivanja autoantitela (neobeležena antitela) iz ispitivanog seruma sa antigenima supstrata, ukoliko ih ima u supstratu (tzv. primarno antitelo). U drugoj fazi se dodaju obeležena (najčešće fluorescein izotiocijanatom-FITC-om) anti-humana antitela, koja će se vezati za neobeležena autoantitela, dodana u prvoj fazi (tzv. sekundarno antitelo). Kada se ovako *kuplovana* antitela osvetle fluorescentnim svetlom određene talasne dužine (450 nm) dolazi do emisije elektrona iz FITC-a, što se u tamnom polju ogleda kao žučkasto-zelenkasta fluorescencija. Pri radu se uvek pripremaju i preparati sa pozitivnim i negativnim kontrolnim serumima (tzv. pozitivna i negativna kontrola). Pri interpretaciji rezultata moguće je dobiti kvalitativne (pozitivnu i negativnu reakciju), a u zavisnosti od razblaženja i semikvantitativne (tj. titar antitela: 1:32, 1:64, 1:128, itd.) rezultate.

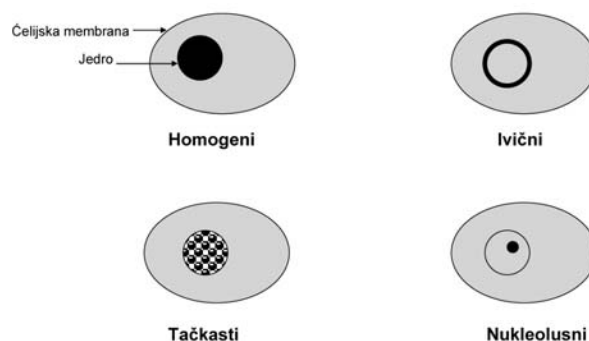
Preciznija imunološka dijagnostika, koja podrazumeva identifikaciju pojedinih specifičnih autoantitela, zahteva pored indirektno imunofluorescencije, dalje laboratorijsko ispitivanje uz korišćenje drugih tehnika, kao što su ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), RIA (Radioimmunoassay), ID (imunodifuzija) i CIE (counterimmunoelectrophoresis).

U imunološkoj laboratoriji Instituta za plućne bolesti, primenom TIIF i korišćenjem dva različita supstrata: tkivnog (kriostatski isečci tkiva pacova) i ćelijskog (HEp-2 ćelije - humane epitelne ćelije kar-

cinoma larinksa) može se ispitati prisustvo ANA u serumima ispitanika. Pri određivanju ANA upotrebom kriostatskih isečaka tkiva jetre pacova serum se najpre testira u početnom razblaženju 1:32. Serumi ispitanika koji su bili ANA pozitivni u titru 1:32, ispituju se dalje u većim razblaženjima. Za vrednost titra ANA uzima se ono poslednje najveće razblaženje ispitivanog seruma pri kojem se na odgovarajućem preparatu još vidi jasna fluorescencija jedra. Kod bolesnika koji su imali pozitivan titar ANA vrši se određivanje i tipa jedarne fluorescencije.

Korišćenjem tkivnog supstrata (kriostatski isečci pacovske jetre), a u slučaju pozitivnih rezultata (postojanje ANA) na fluorescentnom mikroskopu, moguće je razlikovati 4 tipa jedarne fluorescencije (13), koji se mogu uočiti u mirnoj fazi (interfazi) ćelijskog ciklusa (Slika 1.).

Slika br. 1: Tipovi jedarne fluorescencije



Homogeni (difuzni ili solidni) tip fluorescencije- kada je jedro u celini podjednako obojeno fluorohromom. Tada se najčešće radi o reakciji dezoksi-ribonukleoproteina (DNP), histona ili ređe DNK sa njima specifičnim antitelima prisutnim u bolesnikovom serumu. Homogeni tip fluorescencije jedra je u visokom titru prisutan kod bolesnika sa SEL. Javlja se u visokom procentu i kod obolelih od medikamentoznog lupusa, zahvaljujući prisustvu anti-histonskih antitela (AHA) u visokom titru. Ako je prisutan nizak titar ANA kod homogenog tipa fluorescencije jedra, tada može biti u pitanju i neka druga SBVT (1,18).

Ivični (periferni ili membranski) tip fluorescencije jedra karakteriše intenzivna fluorescencija perifernog dela jedra u odnosu na fluorescenciju centralnog dela, koja može biti i odsutna. Ovakav nalaz označava prisustvo anti-dsDNK u bolesnikovom serumu. Karakteriše aktivne forme SEL. Dokazano je da ga mogu proizvoditi i antitela specifična za jednolančanu DNK (ssDNK), pa i anti-DNP antitela i AHA (1,14,15).

Tačkasti (mrljasti) tip fluorescencije se prikazuje u vidu svetlećih tačkica rasutih po jedru. Ovaj tip fluorescencije jedra dokaz je prisustva antitela na različite ekstraktibilne nuklearne antigene (ENA): Sm, U1RNP, SS-A(Ro), SS-B(La), Scl-70, Jo-1 i druge. Sreću se kod ispitivanja seruma obolelih od sklerodermije, Sjögrenovog sindroma, mešane bolesti vezivnog tkiva, polimiozitisa, dermatomiozitisa (15,16,17).

Nukleolusni tip fluorescencije se karakteriše jasnom fluorescencijom nukleolusa, dok okolne strukture jedra ne vezuju konjugat i ne fluoresciraju. Ovaj tip fluorescencije se sreće najčešće kod sklerodermije i to kao odraz reakcije nukleolusnih antigena (PM-Scl, U3 RNP, RNK polimeraze I, fibrilarin, NOR-90 i drugih) sa njima specifičnim antitelima. Nukleolusni tip fluorescencije viđa se dosta često i kod polimiozitisa, gde se radi o prisustvu anti-PM-Scl antitela. Još se dokazuju u serumima bolesnika sa Raynaudovim sindromom i CREST sindromom, a ređe u drugim SBVT (1,17).

Tabela 1. Odnos tipova jedarne fluorescencije i pojedinih nuklearnih antigena

Tip fluorescencije jedra	Antigen odgovoran za tip fluorescencije
Homogeni	DNP, histoni, DNK
Ivični	dsDNK
Tačkasti	Sm (Smith), U1 RNP, SS-A(Ro), SS-B(La), Jo-1, Scl-70
Nukleolusni	PM-Scl, fibrilarin, U3RNP, RNK polimeraza I, NOR-90

Poslednjih godina, tkivni kriosečci se uspešno zamenjuju kulturama ćelija, od kojih se HEp-2 ćelije (humane epitelne ćelije karcinoma larinksa) najčešće koriste (1,2,19,20,21). Prednost ćelijskog supstrata (HEp-2 ćelije) u odnosu na tkivni (kriostatske isečke tkiva) je u tome da se u kulturi pored ćelija u mirnoj fazi (interfazi), nalaze i ćelije u raznim fazama ćelijske deobe. Zahvaljujući prisustvu ćelija u deobi, pri mikroskopskoj interpretaciji rezultata, omogućeno je lakše razlikovanje antitela koja se vezuju za hromatinski materijal ćelija u deobi (pozitivan hromozomski region) od antitela koja su usmerena prema drugim jedarnim strukturama (negativan hromozomski region), kao i prema antigenima viđenim samo u pojedinim fazama ćelijskog ciklusa (centromera), fazama deobe ćelije (centromera, deobno vreteno) ili fazi ćelijske proliferacije (nukleusni antigen ćelija u proliferaciji-PCNA). Korišćenjem HEp-2 ćelija mogu se

detektovati i antitela protiv onih antigena kojih inače nema na tkivnim supstratima (u jetri ili bubregu miševa i pacova), a mogla bi se zapaziti samo u toku deobe ćelije. To su u prvom redu: anti-SS-a (Ro), anti-Scl-70 antitela, anti-centromerna antitela (ACA), anti-PCNA antitela, antitela protiv deobnog vretena i antitela protiv centriola.

Na HEp-2 ćelijama se upotrebom TIIF, takođe mogu uočiti 4 tipa jedarne fluorescencije (1,15).

Homogeni - pored difuzne fluorescencije jedra karakteriše ga i pozitivan hromozomski region u metafazi. Ovaj tip fluorescencije jedra ukazuje na postojanje istih autoantitela u ispitivanom serumu, kao i pri interpretaciji homogenog tipa fluorescencije pri upotrebi tkivnih isečaka.

Ivični - ukazuje na prisustvo istih antitela kao i pri interpretaciji ivičnog tipa jedarne fluorescencije upotrebom tkivnih isečaka. Karakteriše ga fluorescencija periferije jedra sa pozitivnim hromozomskim regionom u metafazi. Negativan hromozomski region ukazuje na prisustvo antitela protiv jedarne membrane.

Tačkasti - pruža više podataka u odnosu na tačkasti tip jedarne fluorescencije dobijen TIIF pri korišćenju tkivnih isečaka. Udružen sa negativnim hromozomskim regionom u metafazi odgovara prisustvu anti-Sm, RNP, SS-A, SS-B, PCNA, SL, Mi-1, Mi-2, Pl-7, Ma i Ku antitelima, a sa pozitivnim hromozomskim regionom prisustvu ACA i anti-Scl-70 antitela. U metafazi se nekad može videti i fluorescencija deobnog vretena (anti-tubularna antitela) sa negativnim hromozomskim regionom u metafazi, koja se u interfazi prikazuje kao nehomogena jedarna fluorescencija.

Nukleolusni - daje intenzivno homogeno obojeno jedarce sa negativnim hromozomskim regionom u metafazi. Ovaj tip jedarne fluorescencije daje pri interpretaciji iste rezultate kao i nukleolusni tip dobijen TIIF pri korišćenju tkivnih isečaka.

Antigeni koji čine strukturu hromozoma (DNK, histoni i centromerni antigeni) nalaze se u hromozomskom regionu, dok se nukleolusni antigeni i ENA nalaze locirani u jedru van hromozomskog regiona. Znači da će se homogeni i membranski tip fluorescencije uočeni na ćelijama u interfazi prikazati fluorescencijom hromozomskih regiona na ćelijama u mitozu, dok će tačkastom i nukleolusnom tipu fluorescencije interfaznih jedara odgovarati mrljasti tip fluorescencije nehromozomskog regiona u mitotskim jedrima (1). Tako, kulture ćelija pružaju znatno veće mogućnosti otkrivanja različitih tipova jedarne fluorescencije i njihovog finijeg diferentovanja.

Centromerni tip jedarne fluorescencije se može detektovati samo na ćelijama u mitozu. On se karakteriše tačkicama fluorescencije u hromozomskom regionu na mestu centromere (deo hromozoma koji u interakciji sa deobnim vretenom učestvuje u njihovoj segregaciji i smatra se visoko specifičnim za CREST sindrom) (1,15).

ZAKLJUČAK

Antinukleusna antitela su antitela koja su usmerena prema strukturnim komponentama ćelijskog jedra.

ANA se najčešće detektuju u serumima obolelih od SBVT, ali i u mnogim drugim bolestima i stanjima, pa čak i kod zdravih osoba. Zahvaljujući razvoju brojnih i vrlo osetljivih specifičnih metoda, moguće je u serumima ispitanika pored ukupnih (tANA) odrediti i specifična ANA (sANA), karakteristična za pojedine antigene jedra. Selektivna pojava pojedinih sANA u određenih SBVT koristi se u dijagnostičke svrhe, za procenu težine bolesti, za praćenje efekata promenjene terapije i za prognozu bolesti. U bolestima koje ne spadaju u SBVT, ANA su uglavnom prisutna u malom titru, a njihovo prisustvo je bez kliničkog značaja.

LITERATURA

- Mirčetić V, Savić-Đurković R, Petrović M, Vukojević P. Antinukleusna antitela. Medicinska knjiga, Beograd, 1995.
- Zagorov M, Draganov M, Murđeva M. Antinuclear antibodies-clinical significance and detection methods. *Trakia Journal of Sciences*, 2004; 2, 48-57.
- Miyawaki S. Present status and problem to measure autoantibodies -antinuclear antibodies. *Rinsho Byori*.2001; 49 (6):575-9.
- Janežić A, Bonači B, Samardžić G i sar. IgE antitela u bolesnika sa SEL. II Kongres imunologa Jugoslavije, V Banja 1989, knjiga sažetaka, 10.9. P.
- Gill J, Quisel A, Rocca P, Walters D. Diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Am Fam Physician* 2003;68:2179-86.
- Tan EM, Cohen AS, Fries JF et al. The 1982 revised criteria in the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25,111271-77.
- Peltier A. Serologie des polyarthritis. *Documenta Geigy-folia rheumatologica*, 1977, 1-16.
- Burnet FM: The clonal selection theory of acquired immunity. London: Cambridge University, Press, 1949.
- Fournie GJ, Lambert PH, Melscher PA. Release DNA in circulation blood and induction of anti-DNA antibodies after injection bacterial lypopolysacharides. *J Exp Med* 1974; 140: 1189-6.
- Grabar P. Autoantibodies and the physiological role of immunoglobulins. *Immunol Today* 1983; 4: 337-40.
- Tan E, Feltkamp T, Smolen J et al. Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. *Arthr Rheum*. 1997;40:1601-11.
- Segovia DA. Drug induced antinuclear antibodies and lupus syndromes. *Drugs* 1976;12,69-77.
- Stites DP, Stobo JD, Wells JV. Osnovna i klinička imunologija. Savremena administracija, Beograd, 1991.
- Beck JS: Antinuclear antibodies: methods of detection and significance. *Mayo Clin Proc*. 1969;44,9,600-19.
- Mc Carty GA, Valencia DW, Fritzler MJ: Antinuclear antibodies, Oxford University press, New York-Oxford 1984, pp 54-69,7-17.
- Lachman P, Kunkel H. Correlation of antinuclear antibodies and nuclear staining patterns. *Lancet*.1961;2:436.
- Ilić T. Antigenska tipizacija antinuklearnih antitela kod obolelih od sistemskog lupus eritematodesa u našoj sredini. Magistarski rad, Medicinski fakultet u Novom Sadu, 1997.
- Sherer Y, Gorstein A, Fritzler MJ, Shoenfeld Y. Autoantibody explosion in systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 2004; 34(2):501-37.
- Cook L. New methods for detection of antinuclear antibodies. *Clin Immunol Immunopathol*. 1998;88:211-20.
- Kern P, Kron M, Hiesche K. Measurement of Antinuclear Antibodies: Assessment of Different Test Systems. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2000; 7(1): 72-78.
- Kašiković-Lečić S. Autoantitela u bolesnika lečenih od aktivne plućne tuberkuloze. Magistarski rad, Medicinski fakultet u Beogradu, 2001.
- Solomon DH, Kavanaugh AJ, Schur PH. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: antinuclear antibody testing. *Arthritis Rheum* 2002; 47:434-44.
- Kavanaugh AF, Solomon DH. Guidelines for immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: Anti-DNA antibody tests. *Arthritis Rheum* 2002; 47:546-55.
- Bizzaro N, Wiik A. Appropriateness in antinuclear antibody testing: from clinical request to strategic laboratory practice. *Clin Exp Rheumatol* 2004; 22: 349-55.