

Przeciwciała przeciwjąderkowe w serodiagnostyce zespołu antyfosfolipidowego

Jakub Ząbek, Agnieszka Palacz, Joanna Pyka, Iwona Krzewska

Zakład Mikrobiologii i Serologii, Instytut Reumatologii im. Eleonory Reicher, Warszawa

SŁOWA KLUCZOWE

ANA o typie „jąderkowym”, aneksyna V w jąderkach, przeciwciała dla aneksyny V, inne przeciwciała przeciwjąderkowe

STRESZCZENIE

WPROWADZENIE Przeciwciała przeciwjąderkowe są wykrywane przeciętnie w 5–10% surowic przeciwciał przeciwjądrowych (*antinuclear antibodies* – ANA) dodatnich, ale zaledwie w około 15% przypadków (a czasem nawet rzadziej) można precyzyjnie ustalić swoistość przeciwciał odpowiedzialnych za ten typ ANA. W skład jąderek wchodzi bardzo wiele białek, np. nukleolina, fibrylaryna, białko spliceosomu (Pm-Scl), różne polimerazy RNA oraz różnego typu i wielkości transkrypty rRNA. Jąderka zawierają także aneksyny (*annexins* – ANX) typu II i V. Wiele z tych białek jest „celem” dla autoprzeciwciał w układowych chorobach tkanki łącznej, a zwłaszcza w twardzinie i zespole nakładania.

CELE Celem pracy było wypracowanie metodyki różnicowania swoistości autoprzeciwciał w przypadku surowic ANA-dodatnich o typie świecenia „jąderkowym” w immunofluorescencji pośredniej (*indirect immunofluorescence* – IIF) ze szczególnym uwzględnieniem przeciwciał dla aneksyny V, należącej do grupy przeciwciał antykoagulatorowych, typowych dla zespołu antyfosfolipidowego (*antiphospholipid syndrome* – APS).

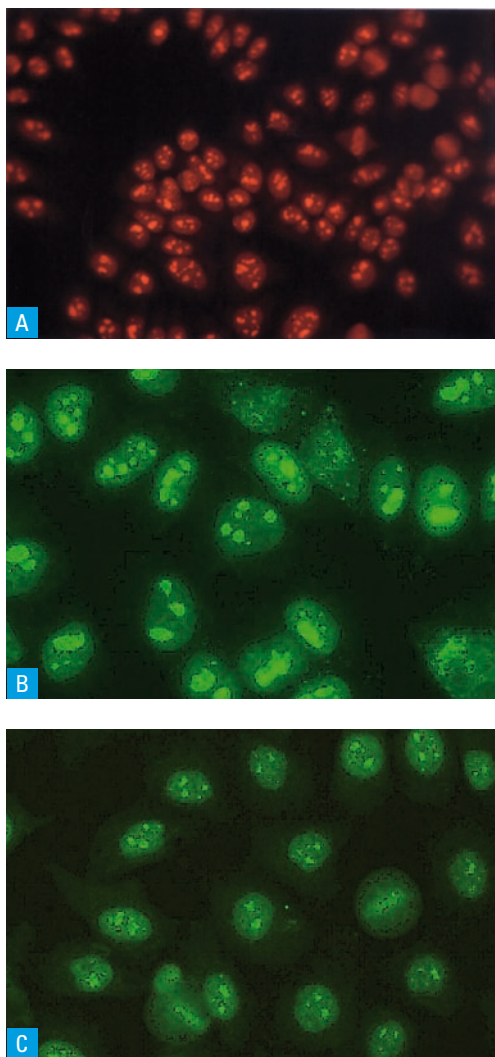
PACJENCI I METODY W surowicach badanej grupy 12 pacjentów (wyselekcjonowanej ze 150 osób chorujących na układowe choroby tkanki łącznej) ANA-dodatnich/Western-blot-ujemnych, a wykazujących typ świecenia „jąderkowy”, oznaczano następujące autoprzeciwciała: ANA metodą IIF, anty-Pm-Scl (marker zespołu nakładania, zapalenia wielomięśniowego i twardziny), antykardiolipinę, anty-ANX-V, anty-RNA-azę – wszystkie metodą ELISA. Oznaczano także (metodą Western-blot) podstawowy zestaw autoprzeciwciał markerowych charakterystycznych dla układowych chorób tkanki łącznej. Zastosowano także RNA-azę w celu eliminacji (poprzez enzymatyczne trawienie) RNA oraz skompleksowanych z RNA białek, które są ewentualnym celem dla autoprzeciwciał dających typ świecenia ANA-jąderkowy.

WYNIKI W 5 z 12 (41,7%) surowic ANA-dodatnich/Western-blot-ujemnych od pacjentów z układowymi chorobami tkanki łącznej wykryto przeciwciała dla ANX-V, kardiolipiny oraz Pm-Scl. W surowicach 2 pacjentów wykryto przeciwciała dla RNA-azy. W żadnej z badanych surowic nie wykryto autoprzeciwciał dla antygenu Scl-70 (marker twardziny) i SS-A (Ro) (marker zespołu Sjögrena), które także mogą dawać typ „jąderkowy” ANA (atypowy). Testem Western-blot służącym do wykrywania przeciwciał w zapaleniu wielomięśniowym tylko w pojedynczych przypadkach wykryto przeciwciała dla antygenu Ku (białko jądrowe), Jo-1 i PI-7 (przeciwciała dla syntetaz tRNA). Współwystępowanie przeciwciał dla ANX-V i dla kardiolipiny stwierdzono w 4 z 5 surowic (80%). Także w przypadku 3 z 5 (60%) surowic stwierdzono współwystępowanie przeciwciał dla ANX-V i antygenu Pm-Scl. RNA-aza użyta jako swoisty „bloker” dla rRNA i RNP-protein spowodowała częściowy lub całkowity zanik świecenia typu jądrowego, ale niezależnie od swoistości badanych surowic (anty-ANX-V, anty-Pm-Scl czy obu swoistości razem). Zaobserwowane skutki preinkubacji substratu (komórki Hep-2) z RNA-azą są niejednoznaczne i mogą być wynikiem zarówno wiązania, jak i nietrawienia antygenu przez RNA-azę, ale także przyłączania i tworzenia przeszkody przestrzennej dla wiązania innych autoprzeciwciał o swoistości antyjąderkowej.

WNIOSKI Te wstępne wyniki są zachęcające, zwłaszcza jeśli chodzi o autoprzeciwciała anty-ANX-V (przeciwciała związane z APS), ale wymagają badań wykonanych na liczniejszych grupach pacjentów z układowymi chorobami tkanki łącznej.

Adres do korespondencji:
dr hab. Jakub Ząbek,
Zakład Mikrobiologii i Serologii,
Instytut Reumatologii
im. Eleonory Reicher,
ul. Spartańska 1, 02-637 Warszawa,
tel.: 022-844-30-67,
fax: 022-844-95-22,
e-mail: jakub.zabek@gmail.com
Pol Arch Med Wewn. 2008;
118 (Suppl): 25-30
Copyright by Medycyna Praktyczna,
Kraków 2008

RYCINA 1 Przykłady typów świecenia jąderkowego w teście ANA-IIF z surowic o różnych swoistościach: **A** – anty-ANX-V, **B** – anty-Pm-Scl, **C** – przeciwno antygenom rRNA i RNA-białko



WPROWADZENIE Przeciwciała przeciwjądrowe, wykrywane w 5–10% przypadków surowic przeciwciał przeciwjądrowych (*antinuclear antibodies* – ANA) dodatnich, są bardzo częstym problemem w serodiagnostyce, ponieważ stanowią aż około 75% surowic (dane własne autorów), w których przy dodatnich ANA nie udaje się ustalić swoistości autoprzeciwciał odpowiedzialnych za ten typ ANA.^{1,2} Jąderka to nieobłonione struktury w obrębie jądra, których główna funkcja polega na wytwarzaniu składowych rybosomów. Są one bogate epitopowo i zawierają cały szereg autoantygenów białkowych, takich jak nukleolina i fibrylaryna, enzymów – polimeraza I RNA, innych nukleaz, a także tzw. pierwotne „transkrypty” polimerazy I RNA oraz antygen Pm-Scl (układ 19 peptydów)^{1,3} i tzw. organizator jąderka (*nucleolar organizing region* – NOR). Jąderka zawierają także aneksyny (*annexins* – ANX) II i V, których rola w jąderkach nie została ostatecznie ustalona, ale wydaje się, że odgrywają ważną rolę w kompletowaniu i transportowaniu rybosomów do cytoplazmy i są związane z polisomami zasocjowanymi z cytoszkieletem.^{4,5} Pewien wkład w generowanie typu jąderkowego ANA mają takie przeciwciała, jak anty-Ro i anty-Scl-70,^{6,7} dając czasem tzw. atypowy typ ANA-jąderkowego, ale w przypadku obu tych przeciwciał dysponujemy czułymi

i swoistymi testami ELISA oraz Western-blot i na ogół nie ma problemów z różnicowaniem tych swoistości od innych⁸. Dodatkowym bodźcem, który skierował naszą uwagę na przeciwciała o typie jąderkowym, był przypadek pacjenta z zespołem nakładania (po wielu latach wystąpił u niego zespół antyfosfolipidowy [*antiphospholipid syndrome* – APS]), u którego przy dodatnich ANA nie mogliśmy ustalić ich swoistości (praca kazuistyczna równolegle złożona do druku w *Polskim Archiwum Medycyny Wewnętrznej*).

W przypadku takich „trudnych” surowic (ANA-dodatnich o nieustalonej swoistości) stosujemy opracowaną w Zakładzie Mikrobiologii i Serologii Instytutu Reumatologii procedurę polegającą na neutralizacji surowicy preparatami bogatymi w antygeny ENA (*extractible nuclear antigens*) w celu przybliżonej oceny, czy przeciwciała, których swoistości nie możemy ustalić, pochodzą z grupy antygenów ENA.⁹ Właśnie w przypadku wspomnianego powyżej pacjenta po procedurze neutralizacji nastąpiła zmiana typu świecenia ANA z homogenno-plamistego na jąderkowy, co ponownie skierowało naszą uwagę na przeciwciała dla ANX-V. Według danych z literatury¹ oraz naszej praktyki diagnostycznej przeciwciała antykardiolipinowe (*anticardiolipin antibodies* – ACA) i przeciwciała dla innych fosfolipidów nie dają w ANA-IIF żadnego typu „świecenia”, z wyjątkiem przeciwciał antykofaktorowych (dane własne, niepublikowane).

Gdyby zatem udało się opracować metodykę różnicowania podstawowych trzech grup przeciwciał przeciwjądrowych, to w niektórych przypadkach – oczywiście po wyeliminowaniu przeciwciał dla antygeny Pm-Scl i przeciwciał dla antygeny RNA-zależnych (np. U₃sn-RNP, rRNA, polimerazy I RNA) – test ANA-IIF mógłby być wstępnym prostym testem „skriningowym” służącym do wykazania obecności przeciwciał antykofaktorowych asocjowanych z APS.^{10,11}

Celem pracy było więc opracowanie metodyki różnicowania swoistości w przypadku surowic ANA(+) o typie jąderkowym ze szczególnym uwzględnieniem różnicowania przeciwciał anty-ANX-V i innych przeciwciał przeciwjądrowych.

PACJENCI I METODY Badaniom poddano surowice 12 pacjentów (wybrane ze 150 surowic) z układową chorobą tkanki łącznej hospitalizowanych w klinikach Instytutu Reumatologii, które w badaniu ANA wykazywały typ świecenia „jąderkowy”, ale wyniki testu Western-blot były ujemne.

W surowicach oznaczano następujące parametry:

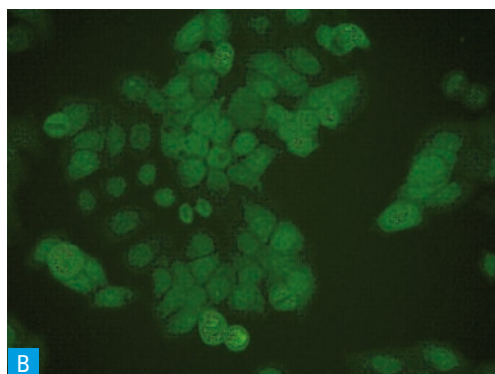
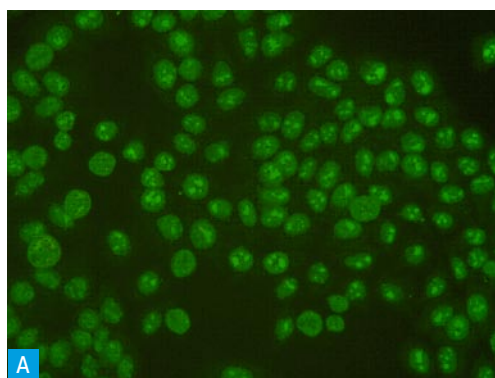
- 1 ANA metodami IIF i „Colorzyme” (na preparatach komórek Hep-2 firmy Biomedica i „Euroimmun”)
- 2 przeciwciała dla kardiolipiny metodą ELISA z zastosowaniem testów (firmy Biomedica Poland Sp. z o.o.)
- 3 przeciwciała dla antygeny Pm-Scl metodą ELISA (firmy Biomedica Poland Sp. z o.o.)

TABELA 1 Częstość występowania wybranych autoprzeciwciał w badanej grupie surowic ANA – dodatniej (typ jąderkowy)

Nr pacjenta	Badane autoprzeciwciała ^a			
	anty-kardiolipina	anty-ANX-V	anty-Pm-Scl	anty-RNA-aza
13098	–	–	–	–
15497	+++	–	–	–
15333	+	+/-	–	+/-
15040	++	+	+	+
14765	+	+	–	–
15302	–	–	+	–
15239	–	–	+/-	–
5748	+	+	+	–
18883	–	+/-	+	–
19340	–	–	–	–
21812	–	–	–	+
23775	–	–	–	–

a Miana przeciwciał oznaczane w skali pięciostopniowej (– do +++)

- 4** przeciwciała dla antygenu ANX-V metodą ELISA (firmy Biomedica Poland Sp. z o.o.)
- 5** przeciwciała dla rybonukleazy oznaczanej metodą własną w preparatach RNA-azy z trzustki cielęcej 5 razy krystalizowanej (firmy Koch-Light Labs. Ltd)
- 6** test Western-blot typ ANA-ENA-recom-Line (firmy Biomedica Sp. z o.o.)
- 7** test Western-blot typ “Myositis” (firmy Euroimmun)
- 8** metoda neutralizacji przeciwciał preparatem RTE_x i BSE_x w opracowaniu własnym⁹
- 9** znakowanie przeciwciał anty-ANX-V i RNA-aza Fluoro Tag™ FITC Conjugation Kit (Sigma)



RYCINA 2

Wygaszanie świecenia typu jąderkowego po preinkubacji kom. Hep-2 z RNA-azą:
A – kontrola,
B – preinkubacja z RNA-azą

10 oznaczanie mian ANX-V metodą ELISA testem firmy Pointe Scientific

11 monoklonalne surowice anty-ANX-V (firmy Biomedica Poland Sp. z o.o. – dystrybutor).

WYNIKI Wszystkie badane surowice były ujemne w teście Western-blot ANA/ENA-recom Line, dlatego szczególnie dokładnie analizowano obrazy z mikroskopu fluorescencyjnego (stosując różne rozcieńczenia badanych surowic) na obecność przeciwciał charakterystycznych dla antygenu NOR oraz fibrylaryny i polimerazy I, gdyż dają one nieco odmienny typ ANA.¹ Dodatkowo wykonano oznaczenia metodą IIF oraz ELISA przeciwciała charakterystycznego dla ANA typu „jąderkowego” – anty-Pm-Scl, dla ANX-V (**RYCINA 1**). Obecność przeciwciał dla RNP-protein, RNA-polimerazy I oraz „transkryptów” rRNA (o różnym ciężarze cząsteczkowym) wykazywaliśmy metodą blokowania odczynu ANA-IF wysoko oczyszczoną RNA-azą, która jak wiadomo inaktywuje antygeny z grupy Usn-RNP i trawi transkrypty rRNA (obecne w jąderkach). Dodatkowo metodą ELISA i Western-blot oznaczano obecność takich przeciwciał, jak anty-Cl, anty-RNA-aza, anty-syntetazy (Jo-I, Pl-7 i Pl-12), anty-Mi-2 oraz anty-Ku. Wyniki oznaczeń przedstawiono w **TABELI 1**. Stwierdzono przeciwciała dla kardiolipiny w 5 z 12 (41,7%) surowic, dla antygenu Pm-Scl również w 41,7% i dla ANX-V także w 41,7%. W 2 przypadkach (na 12) stwierdzono zwiększone miana przeciwciał dla RNA-azy.

W żadnej z badanych surowic nie wykryto auto-przeciwciał dla antygenu Scl-70 i SS-A (Ro), które także mogą dawać typ „jąderkowy” ANA (atypowy). W teście Western-blot, służącym do wykrywania przeciwciał w zapaleniu wielomięśniowym, tylko w pojedynczych przypadkach wykazano obecność przeciwciał dla antygenu Ku, Jo-I i badanych Pl-7. Współwystępowanie przeciwciał dla ANX-V i dla kardiolipiny stwierdzono w 4 z 5 surowic (80%). W 3 z 5 surowic (60%) stwierdzono współwystępowanie przeciwciał dla ANX-V i antygenu Pm-Scl.

RNA-aza – zastosowana jako swoisty blocker przeciwciał dla wspomnianych antygenów RNA-zależnych (w 9 przypadkach z 12) – powodowała całkowite wygaszenie lub znaczne osłabienie (w metodzie ANA-IIF) świecenia typu „jąderkowego”. Wyniki preinkubacji wybranych surowic z RNA-azą przedstawiono na **RYCINIE 2**.

Problem seronegatywności surowic pod względem obecności w nich autoprzeciwciał markerowych dotyczy większości układowych chorób tkanki łącznej, a jego przyczyny są różnorakie. Po pierwsze, może on być wynikiem genetycznie uwarunkowanej odpowiedzi układu odpornościowego (typ antygenów układu zgodności tkankowej) na określony autoantypen.¹ Po drugie, nieobecność autoprzeciwciał markerowych może być wynikiem związania tychże w tankach (kompleksy *in situ*), ewentualnie związania auto-przeciwciał w krążących kompleksach immunologicznych. W obu przypadkach mamy ten sam

problem diagnostyczny, a mianowicie brak auto-przeciwciała markerowego (należącego do kryteriów diagnostycznych), co w skrajnych przypadkach uniemożliwia ustalenie rozpoznania. W Zakładzie Mikrobiologii i Serologii Instytutu Reumatologii w kooperacji z klinikami Instytutu Reumatologii oraz Instytutem Reumatologii RAMS (Moskwa) zajmujemy się tym problemem już od kilku lat.

Szczególnie trudne jest ustalenie swoistości w obrębie autoprzeciwciał dających ANA o typie „jąderkowym”. Przeciwciała przeciwjąderkowe są wykrywane przeciętnie w 5–10% surowic ANA-dodatnich, ale zaledwie w około 15% (a czasem nawet mniej) przypadków można ustalić precyzyjnie swoistość przeciwciał odpowiedzialnych za ten typ ANA. W skład jąderek wchodzi bardzo wiele białek, np. nukleolina, fibrylaryna, Pm-Scl, różne polimerazy RNA oraz różnego typu i wielkości transkrypty rRNA. Jąderka zawierają także ANX (typ II i V). Wiele z tych białek jest „celem” dla autoprzeciwciał w układowych chorobach tkanki łącznej, a zwłaszcza w twardzinie i zespole nakładania.^{12,13}

Ponadto w typie „jąderkowym” ANA mamy tylko dwa podstawowe podtypy „świecenia” w metodzie IIF, a mianowicie homogeny (charakterystyczny dla przeciwciał anty-Pm-Scl, anty-ANX-V) oraz ziarnisty (dla pozostałych autoantygenów „jąderkowych” z grupy RNA-zależnych), na podstawie których nie można jednoznacznie różnicować swoistości autoprzeciwciał. Z reguły jednak mamy do czynienia z nakładaniem się obu tych typów, co daje w efekcie typ „pośredni” – homogenno-plamisty, analogicznie jak w przypadku ANA-dodatnich surowic toczniowych, zawierających np. przeciwciała anty-Sm i anty dsDNA.⁶

W przypadku prezentowanej grupy surowic od pacjentów z układowymi chorobami tkanki łącznej, dobieranej pod kątem obecności przeciwciał przeciwjąderkowych, w 5 z 12 (41,7%) surowic ANA-dodatnich/Western-blott-ujemnych wykryto przeciwciała dla ANX-V, kardiolipiny i Pm-Scl. Uzyskane duże odsetki częstości występowania 3 analizowanych autoprzeciwciał są znacznie większe od odsetków uzyskiwanych dla homogennych grup pacjentów z chorobami, dla których wspomniane przeciwciała są markerami.¹² Przeciętne częstości występowania przeciwciał dla antygeny Pm-Scl w grupach zespołu nakładania, zapalenia wielomięśniowego i skórno-mięśniowego wynoszą z reguły 2–24%, ACA w układowych chorobach tkanki łącznej 15–35% dla tocznia rumieniowatego układowego, 4–49% dla reumatoidalnego zapalenia stawów i <15% dla twardziny.^{1,13} Również częstość występowania przeciwciał anty-ANX-V w APS, w którym występują one najczęściej, z reguły nie przekraczają 20% analizowanych przypadków.¹⁴

Wielokrotnie większa częstość występowania tych przeciwciał, a zwłaszcza anty-Pm-Scl i anty-ANX-V, wskazują, że występowanie przeciwciał ANA o typie jądrowym należy brać pod uwagę w dalszym toku ustalania ich swoistości, gdyż

w sposób istotny zwiększa wykrywalność tych ważnych autoprzeciwciał markerowych.

Ponadto zaobserwowane skutki preinkubacji substratu, jakim są komórki Hep-2 z RNA-azą, są niejednoznaczne i mogą być wynikiem zarówno wiązania, jak i wytrawienia antygeny przez RNA-azę, ale także przyłączania i tworzenia przeszkody przestrzennej dla wiązania innych autoprzeciwciał o swoistości antyjądrowej.

WNIOSKI Te wstępne wyniki są zachęcające, zwłaszcza w odniesieniu do autoprzeciwciał anty-ANX-V (przeciwciała związane z APS), ale konieczne są badania na liczniejszych grupach pacjentów z układowymi chorobami tkanki łącznej – wskazuje to, że stosunkowo często występują one razem, co może być charakterystyczne dla jakiegoś określonego podtypu klinicznego twardziny lub zespołu nakładania skojarzonego z APS. Ponieważ dokładna charakterystyka kliniczna grupy nie jest znana, a liczba surowic jest relatywnie niewielka, badania będą kontynuowane na większych grupach surowic dających ten typ ANA. Jednak już w efekcie badań tej stosunkowo niewielkiej grupy surowic rysuje się możliwość takiego dopracowania metodyki, która pozwalałaby, choć tylko z pewnym prawdopodobieństwem, w przypadku surowic ANA o typie jądrowym (Western-blott-ujemnych) wykrywać obecność przeciwciał z grupy charakterystycznej dla APS, które według danych dostępnych w literaturze nie dają odczynów ANA-dodatnich.¹

Konkretne wyniki wskazują na możliwość wykrywania metodą ANA-IIF przeciwciał dla ANX-V zlokalizowanej w jąderkach. Wiadomo, że ANX-V jest jednym z białek kofaktorowych dla przeciwciał ACA – ważnego markera zespołu antyfosfolipidowego. Dopracowanie techniki oznaczania przeciwciał anty-ANX-V może uczynić z metody ANA-IIF (w przypadku świecenia typu jądrowego) prosty i użyteczny test w przypadku układowych chorób tkanki łącznej ze współwystępującym APS.

PIŚMIENNICTWO

- 1 von Mühlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum*. 1995; 24: 323-358.
- 2 Ząbek J. Metody wykrywania autoprzeciwciał „markerowych” w chorobach z autoimmunizacją. W: Kowalski ML (red.). *Immunologia kliniczna*. Łódź, Mediton Oficyna Wydawnicza, 2000: 787-806.
- 3 Ząbek J. Podstawowe zasady racjonalnej serodiagnostyki autoprzeciwciał markerowych w układowych chorobach tkanki łącznej. *Reumatologia*. 2005; 43: 335-340.
- 4 Sun H, Salem HH, Bird P. Nucleolar and cytoplasmic localization of annexin V. *FEBS Lett*. 1992; 314: 425-429.
- 5 Vedeler A, Hollas H. Annexin II is associated with mRNAs which may constitute a distinct subpopulation. *Biochem J*. 2000; 348: 565-572.
- 6 van Venrooij WJ, Maini RN (red.). *Manual of biological markers of disease*. Dordrecht, Boston, London, Kluwer Academic Publishers. 1994.
- 7 Mimori T, Akizuki M, Yamagata H, et al. Characterization of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis-scleroderma overlap. *J Clin Invest*. 1981; 68: 611-620.
- 8 Ząbek J. Przyczyny niepowodzeń w identyfikacji swoistości autoprzeciwciał ANA w surowicach pobranych od pacjentów z układowymi chorobami tkanki łącznej. *Reumatologia*. 2004; 42: 416-426.
- 9 Ząbek J, Palacz A, Krzewska I, et al. Wstępne badania nad metodyką oznaczania surowiczych autoprzeciwciał niezaliczanych do kryteriów

diagnostycznych układowych chorób tkanki łącznej. Reumatologia. 2006; 44: 293-297.

10 Zimmermann-Górska I. XX-lecie zespołu antyfosfolipidowego. Pol Arch Med Wewn. 2007; 117: 8-12.

11 Erkan D, Lockshin MD. Czym jest zespół antyfosfolipidowy. Med Dopl. 2006; 15: 160-170.

12 Reveille JD, Solomon DH. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests. Anticentromere, Scl-70, and nucleolar antibodies. Arthritis Rheum. 2003; 49: 399-412.

13 Oertelt S, Podda M, Gershwin ME. Antinucleolar antibodies. In: Shoenfeld Y, Gershwin ME, Meroni PL (eds.). Autoantibodies. Elsevier B.V. 2007: 135-139.

14 Alekberowa Z, Reshetnyak T, Ząbek J, et al. Co-occurrence of antibodies to beta2-glycoprotein I, prothrombin and antithrombin III in the sera of patients with SLE, APS and PAPS. Nauczno-Praktyczeskaja Rewmatologija. 2002; 4: 71-75.

Antinucleolar antibodies in diagnostics of antiphospholipid syndrome

Jakub Ząbek, Agnieszka Palacz, Joanna Pyka, Iwona Krzewska

Department of Microbiology and Serology, Eleonora Reicher Rheumatology Institute, Warszawa, Poland

KEY WORDS

ANA of nucleolar pattern, annexin V in nucleolins, anti-annexin V antibodies, other anti-nucleolar antibodies

ABSTRACT

INTRODUCTION Anti „nucleolar” antibodies are estimated to be present in about 5–10% of anti-nuclear antibodies-positive (ANA), but only in about 15% of cases (sometimes in lower percentages) it is possible to assess precisely the specificity of antibodies responsible for this pattern of ANA. Nucleoli are composed of many proteins, e.g. nucleolin, fibrillarin, Pm-Scl (spliceosome component), RNA-polymerases and different sizes rRNA transcripts. Nucleoli also contain annexins (ANX) II and V. Many of these proteins are target molecules for autoantibodies generated in connective tissue diseases (CTD) – especially in scleroderma and overlap syndromes.

OBJECTIVES The aim of this study was to work out methods for differentiation of antibody specificities in the case of sera ANA-positive with the nucleolar pattern in indirect immunofluorescence (IIF), with a particular concern directed to anti-Annexin V antibodies (belonging to anticofactor antibody system – characteristic of antiphospholipid syndrome [APS]).

PATIENTS AND METHODS In the sera of the tested group of 12 (selected from 150 subjects suffering from different kinds of CTD) ANA-positive (Western-blott negative) and showing the nucleolar type of ANA pattern patients, the following autoantibodies were assessed: ANA-IIF, anti-Pm-Scl (overlap syndrome marker), anticardiolipin, antiannexin V, anti-RNA-ase – all using the ELISA method. With the use of the Western-blott method a basic set “marker” autoantibody in CTD was estimated, and the RNA-ase was used for elimination (by enzymatic digestion) of RNA-s and RNA-protein complexes – a possible target for autoantibodies giving the nucleolar pattern.

RESULTS In 5 out of 12 sera (41.7%) of ANA-positive/Western-blott-negative CTD patients antibodies against Annexin V, cardiolipin, Pm-Scl were detected. In 2 out of 12 patient sera antibodies to the RNA-ase were found. None of the tested sera showed the presence of autoantibodies against antigen Scl-70 (scleroderma marker), and SS-A (Sjögren syndrome marker), which can also give the atypical nucleolar ANA-pattern. Only in few sera “myositis” – blotts showed antibodies to antigen Ku (nuclear protein), Jo-1 and PI-7 (anti-tRNA synthetases – polymyositis markers) – myositis and overlap syndrome markers. In 80% of tested sera the co-appearance of anti-ANX-V and anticardiolipin antibodies was observed. The presence of antibodies against ANX-V together with Pm-Scl was confirmed in 60% of sera. The RNA-ase, used as a specific rRNA and RNP-protein blocker, resulted in a partial or total disappearance of the “nucleolar” pattern, but independently of the tested serum specificity (anti-ANX-V, anti-Pm-Scl or both together). The observed RNA-ase treatment of the Hep-2 cells effects are equivocal and they may result from either binding or digestion the antigen by the RNA-ase, but also from forming a sterical hindrance for the autoantigen binding to another “nucleolar” antigens.

CONCLUSIONS These preliminary results are interesting, especially as concerns anti-ANX-V auto-antigens (associated with APS), but they require further research including bigger groups of CTD patients.

Correspondence to:

Assoc. Prof. Jakub Ząbek MD, PhD,
Zakład Mikrobiologii i Serologii,
Instytut Reumatologii
im. Eleonory Reicher,
ul. Spartańska 1,
02-637 Warszawa, Poland,
phone: +48-22-844-30-67,
fax: +48-22-844-95-22,
e-mail: jakub.zabek@gmail.com
Pol Arch Med Wewn. 2008; 118
(Suppl): 25-30
Copyright by Medycyna Praktyczna,
Kraków 2008